

Immunisierung mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen

-

Einfluß von Mitgliedern der TNF- bzw. TNFR-Superfamilie auf die Immunantwort gegen Antigene von HPV-16

Der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Carsten Wiethe

aus Fürstenau

1. Referent: Prof. Dr. Jürgen Bode

2. Referent: Prof. Dr. Jürgen Wehland

eingereicht am: 13.01.2003

mündliche Prüfung (Disputation) am: 11.04.2003

2003 (Druckjahr)

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit Prof. Dr. Jürgen Bode, im folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Leder, C., Kleinschmidt, J., Wiethe, C. & Müller, M. (2001) Enhancement of Capsid Gene Expression: Preparing the Human Papillomavirus Type 16 Major Structural Gene L1 for DNA Vaccination Purposes. *J. Virol.* **75**:9201-9209.

Wiethe, C., Dittmar, K., Doan, T., Lindenmaier, W. & Tindle, R. 2002. Provision of 4-1BBL enhances effector and memory CTL responses generated by immunisation with dendritic cells expressing a human tumour specific antigen. Submitted (*J. Immunology*).

Tagungsbeiträge

Wiethe, C., Dittmar, K., Doan, T., Lindenmaier, W. & Tindle, R.: **Co-stimulatory molecules enhance CTL responses generated by immunisation with dendritic cells expressing a human tumour antigen.** (Poster) 7th International Symposium on Dendritic Cells (DC2002), Bamberg (2002).

Wiethe, C., Doan, T., Lindenmaier, W. & Tindle, R.: **DCs co-expressing TNF ligand receptor related co-stimulatory molecules elicit enhanced CTL responses to a human tumour antigen.** (Poster/Vortrag) Vaccines and Immunotherapeutics Conference (V&I), Gold Coast, Australia (2002).

Wiethe, C., Doan, T., Lindenmaier, W. & Tindle, R.: **Co-expression of costimulatory molecules enhances CTL responses evoked by E7-expressing dendritic cells.** (Poster/Vortrag) 20th International Papillomavirus Conference (HPV2002), Paris, France (2002).

Wiethe, C., Doan, T., Lindenmaier, W. & Tindle, R.: **Enhanced CTL responses to a human tumour antigen are evoked by DCs co-expressing TNF ligand-receptor co-stimulatory molecules.** (Poster/Vortrag) 32nd Annual Scientific Meeting of the Australasian Society for Immunology (ASI2002), Brisbane, Australia (2002).

Inhaltsverzeichnis

VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION	I
INHALTSVERZEICHNIS	II
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	X
1 EINLEITUNG	1
1.1 Papillomaviren und ihr Einfluß auf die Krebsentstehung	1
1.1.1 Das Humane Papillomavirus HPV-16	2
1.2 Immuntherapie zur Behandlung von Tumoren und chronischen Infektionskrankheiten	5
1.3 Dendritische Zellen	8
1.3.1 Unreife und ausgereifte dendritische Zellen	8
1.3.2 Entwicklung dendritischer Zellen	9
1.3.3 Antigenaufnahme	10
1.3.4 Stimulation, Migration und Aktivierung dendritischer Zellen	11
1.3.5 Antigenprozessierung	12
1.3.6 Aktivierung von T-Lymphozyten	14
1.3.7 <i>In vitro</i> Kultivierung und Charakterisierung von murinen dendritischen Zellen	15
1.3.8 Immuntherapie mit dendritischen Zellen	16
1.4 Tumor-Nekrosis-Faktor- (TNF-) Superfamilie und TNF-Rezeptor- (TNFR-) Superfamilie	18
1.4.1 Effekt von CD40/CD40L auf dendritische Zellen und T-Zellen	20
1.4.2 Einfluß von RANK/RANKL auf dendritische Zellen und T-Zellen	21
1.4.3 Einfluß von 4-1BB/4-1BBL auf dendritische Zellen und T-Zellen	22
1.4.4 Bedeutung der TNF/TNFR-Paare für die Immuntherapie	23
1.5 Adenovirale Vektoren für den Gentransfer	24
1.5.1 Biologie des Adenovirus	25
1.5.1.1 Struktur des Adenoviruskapsids	25
1.5.1.2 Organisation des Genoms der Adenoviren	26
1.5.1.3 Infektionszyklus von Adenovirus 5	27
1.5.2 Vorteile adenoviraler Vektoren in der Genthherapie	29
1.5.3 Herstellung adenoviraler Vektoren	30
1.5.4 Adenovirale Vektoren mit regulierbarer Transgen-Expression	32
1.6 Mausmodelle zur Untersuchung der Immunantwort gegen HPV-16	33
1.7 Aufgabenstellung	36

2	MATERIAL UND METHODEN	37
2.1	Geräte	37
2.2	Materialien	37
2.3	Molekularbiologische Methoden	38
2.3.1	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	38
2.3.2	Verwendete Plasmide	38
2.3.3	DNA-Minipräparation	39
2.3.4	DNA-Maxipräparation	39
2.3.5	DNA-Restriktionsspaltungen	40
2.3.6	DNA-Ligation	40
2.3.7	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	41
2.3.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegele	41
2.3.9	Auffüllung von überhängenden DNA-Enden	41
2.3.10	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	42
2.3.11	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	42
2.3.12	Phenol/Chloroform Extraktion und DNA-Fällung	43
2.3.13	Transformation	43
2.3.14	Cosmid-Verpackung in Lambda-Bacteriophagenpartikel	44
2.3.15	Maxipräparation von Adenocosmid-DNA	44
2.3.16	Isolierung der RNA aus murinen Lymphozyten	45
2.3.17	Erststrang cDNA-Synthese	45
2.3.18	Polymerasekettenreaktion (PCR)	45
2.3.19	Zero Blunt® TOPO® PCR Klonierungssystem	47
2.3.20	DNA-Sequenzierung	47
2.4	Methoden für die Kultur eukaryontischer Zellen	48
2.4.1	Zelllinien	48
2.4.2	Kulturmedien und Lösungen	48
2.4.3	Zellzahlbestimmung	49
2.4.4	Passagieren von Zellen	50
2.4.5	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	50
2.4.6	Transfektion (Calciumphosphat-Kopräzipitation)	50
2.4.7	Kotransfektion	51
2.4.8	Isolierung und Kultivierung muriner dendritischer Zellen	51
2.4.9	Infektion muriner dendritischer Zellen	52
2.4.10	Infektion humaner dendritischer Zellen	52
2.5	Methoden zur Herstellung replikationsdefizienter Adenoviren	53
2.5.1	Replikationsdefiziente rekombinante Adenoviren	53
2.5.2	Herstellung primärer Adenovirusstocks	53
2.5.3	Herstellung sekundärer Adenovirusstocks	53
2.5.4	Präparation adenoviraler DNA	54
2.5.5	Herstellung CsCl-gereinigter Adenovirusstocks	54

Inhaltsverzeichnis	IV
2.5.6 Dialyse CsCl-gereinigter Adenovirusstocks	55
2.5.7 Bestimmung des Titors der dialysierten CsCl-gereinigten Adenovirusstocks	56
2.5.8 Fluoreszenzmikroskopie zum Nachweis der EGFP-Expression	56
2.6 Nachweis der Transgen-Expression	56
2.6.1 Präparation der Zellysate	56
2.6.2 SDS-Gelelektrophorese	57
2.6.3 Western-Blot	58
2.6.4 Immunozytochemische Färbungen	58
2.6.5 FACS-Messung (Durchflußzytometrie)	60
2.7 Methoden zur Untersuchung der Immunantwort in Mäusen	61
2.7.1 Peptid- und Protein-Antigene	61
2.7.2 Immunisierung mit dendritischen Zellen	62
2.7.3 Immunisierung mit dem Peptid-Vakzin als Standard bzw. mit dem HPV-16 E7-Protein	62
2.7.4 <i>In vitro</i> Restimulation	62
2.7.4.1 Zelluläre <i>in vitro</i> Restimulation	63
2.7.4.2 <i>In vitro</i> Restimulation ohne APC-Depletion durch Zugabe des Peptides	63
2.7.5 ⁵¹ Chromium-Zytotoxizitätsassay (CTL-Assay)	64
2.7.6 IFN γ -ELISPOT	65
2.7.7 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)	66
2.8 Statistische Berechnungen	67
3 ERGEBNISSE	68
3.1 Herstellung und Charakterisierung rekombinanter Adenoviren mit HPV-16 Sequenzen	68
3.1.1 Verwendete HPV-16 Sequenzen	69
3.1.2 Konstruktion von adenoviralen Cosmiden mit HPV-16 Sequenzen	71
3.1.2.1 Klonierung von pAdcosE7mutIRESegfp	73
3.1.2.2 Klonierung von pAdcosL1 Δ CIRESegfp	74
3.1.2.3 Klonierung von pAdcosL1/E7 ₁₋₆₀ IRESegfp	74
3.1.2.4 Klonierung von pAdcosL1/E7mutIRESegfp	74
3.1.2.5 Klonierung der adenoviralen Cosmidvektoren mit Pflanzen-Codon optimierter L1-Sequenz	75
3.1.3 Herstellung und Aufreinigung replikationsdefizienter Adenoviren mit HPV-16 Sequenzen	77
3.1.3.1 Herstellung primärer Adenovirusstocks	77
3.1.3.2 Herstellung dialysierter CsCl-gereinigter Adenovirusstocks	79
3.1.4 Charakterisierung der adenoviralen HPV-16 Konstrukte und Nachweis der Transgen-Expression	80
3.1.4.1 Präparation und Charakterisierung der adenoviralen DNA	80
3.1.4.2 Immunozytochemische Färbungen	83
3.1.4.3 Nachweis der Transgen-Expression durch Western Blot	85
3.2 Herstellung und Charakterisierung rekombinanter Adenoviren mit kostimulatorischen Molekülen	86
3.2.1 Konstruktion von regulierbaren adenoviralen Cosmiden mit kostimulatorischen Molekülen	87
3.2.1.1 Klonierung von pAdcosTOMCD40IRESegfp	91

Inhaltsverzeichnis	V
3.2.1.2 Klonierung von pAdcosTOMCD40LIRESegfp	92
3.2.1.3 Klonierung von pAdcosTOM4-1BBIRESegfp	92
3.2.1.4 Klonierung von pAdcosTOM4-1BBLIRESegfp	94
3.2.1.5 Klonierung von pAdcosTOMRANKIRESegfp	95
3.2.1.6 Klonierung von pAdcosTOMRANKLIRESegfp	95
3.2.2 Herstellung und Aufreinigung replikationsdefizienter Adenoviren mit kostimulatorischen Molekülen	96
3.2.2.1 Herstellung primärer Adenovirusstocks unter Repression der Transgen-Expression	96
3.2.2.2 Herstellung dialysierter CsCl-gereinigter Adenovirusstocks	98
3.2.3 Charakterisierung der rekombinanten Adenoviren und Expressionsnachweis der kostimulatorischen Molekülen	99
3.2.3.1 Präparation und Charakterisierung der adenoviralen DNA	99
3.2.3.2 Immunozytochemische Färbungen	100
3.3 Infektion dendritischer Zellen mit adenoviralen Vektoren	105
3.3.1 Generierung muriner dendritischer Zellen und deren Infektion mit adenoviralen Vektoren	105
3.3.2 Expression der HPV-16 Sequenzen in infizierten dendritischen Zellen	108
3.3.2.1 Infektion muriner dendritischer Zellen und Expressionsnachweis der HPV-16 Sequenzen	108
3.3.2.2 Infektion humaner dendritischer Zellen und immunozytochemischer Nachweis der Expression der HPV-16 Sequenzen	111
3.3.3 Effekt der kostimulatorischen Moleküle auf die Ausreifung der dendritischen Zellen	113
3.4 Analyse der HPV-16-spezifischen Immunantwort nach Vakzinierung mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen	120
3.4.1 Vorversuche zur Immunisierung mit Peptid bzw. Protein	122
3.4.2 HPV-16-spezifische Immunantwort nach Immunisierung mit Adenovirus-infizierten dendritischen Zellen	127
3.4.2.1 Analyse der direkten Effektor-T-Zellantwort	129
3.4.2.2 Analyse der <i>memory</i> T-Zellantwort	134
3.4.2.3 HPV-16 L1-spezifische Antikörperantwort	142
3.5 Einfluß des Transfers von kostimulatorischen Molekülen auf die HPV-16 E7-spezifische Immunantwort	145
3.5.1 Effekt von 4-1BBL auf die Immunantwort	145
3.5.2 Effekt der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD40L, RANK und RANKL	147
3.5.3 Synergistischer Effekt der kostimulatorischen Moleküle 4-1BBL, RANK und RANKL	152
4 DISKUSSION	157
4.1 Dendritische Zellen	157
4.1.1 Generierung dendritischer Zellen	158
4.1.2 Gentransfer in dendritische Zellen mit adenoviralen Vektoren	159
4.1.3 Einfluß der kostimulatorischen Moleküle auf die dendritischen Zellen	161
4.2 Vakzinierung mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen gegen Antigene von HPV-16	163
4.2.1 Etablierung des Mausmodells	164

Inhaltsverzeichnis	VI
4.2.2 Induktion einer humoralen Immunantwort spezifisch für HPV-16 L1	165
4.2.3 Untersuchung der HPV-16-spezifischen Effektor-T-Zellantwort	167
4.2.4 Initiation einer HPV-16-spezifischen <i>memory</i> T-Zellantwort	169
4.3 Einfluß der kostimulatorischen Moleküle auf die immunstimulatorische Eigenschaft von dendritischen Zellen	173
4.3.1 Einfluß von 4-1BBL auf die E7-spezifische T-Zellantwort	173
4.3.2 Effekt der Expression von RANK/RANKL auf die E7-spezifische T-Zellantwort	175
4.3.3 Einfluß von CD40/CD40L auf die E7-spezifische T-Zellantwort	176
4.3.4 Synergistischer Effekt von 4-1BBL und RANK/RANKL	177
4.4 Schlußfolgerung und Ausblick	179
5 ZUSAMMENFASSUNG	181
6 LITERATURVERZEICHNIS	182
VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	207
DANKSAGUNG	211
LEBENS LAUF	212

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	HPV-16 Genom (I) und Infektionszyklus (II).	4
Abb. 1.2:	Schematische Darstellung der Differenzierung dendritischer Zellen.	12
Abb. 1.3:	Schema einer Immuntherapie mit dendritischen Zellen.	18
Abb. 1.4:	Schematische Übersicht der Interaktion zwischen professionellen APC und T-Zellen zur Aktivierung von T-Zellen und Initiation einer T-Zellimmunantwort.	20
Abb. 1.5:	Schematische Darstellung des Adenoviruskapsids.	25
Abb. 1.6:	Schematische Organisation des Genoms von Adenovirus 5.	27
Abb. 1.7:	Übersicht über das adenovirale Cosmidklonierungssystem zur Herstellung rekombinanter replikationsdefizienter Adenoviren.	31
Abb. 1.8:	Schematische Darstellung des Tetracyclin-regulierten Expressionssystems (TREX) für die Herstellung adenoviraler Vektoren mit regulierbarer Expressionskassette.	33
Abb. 3.1:	Schematische Darstellung der verwendeten HPV-16 Sequenzen.	69
Abb. 3.2:	Schematische Darstellung der Konstruktion der bicistronischen Expressionskassetten mit HPV-16 Sequenzen als erstem Cistron.	71
Abb. 3.3:	Schematische Übersicht der Insertion der HPV-16 Expressionskassetten in die deletierte E1-Region des adenoviralen Cosmidvektors.	73
Abb. 3.4:	Herstellung replikationsdefizienter rekombinanter Adenoviren mit HPV-16 Sequenzen nach Transfektion der adenoviralen Cosmid-DNA in 293LP.	79
Abb. 3.5:	Charakterisierung der adenoviralen DNA der rekombinanten Vektoren mit HPV-16 Sequenzen.	82
Abb. 3.6:	Indirekter Nachweis der Expression der HPV-16 L1-Proteine und L1/E7-Fusionsproteine in infizierten A549 Zellen durch immunozytochemische Färbungen spezifisch für HPV-16 L1.	83
Abb. 3.7:	Indirekter HPV-16 E7-spezifischer Nachweis der Expression von E7 und des E7-Teils in den L1p/E7-Fusionsproteinen durch immunozytochemische Färbungen infizierter A549 Zellen.	84
Abb. 3.8:	Indirekter Nachweis der HPV-16 Transgen-Expression mittels Western Blot.	86
Abb. 3.9:	Schematische Darstellung der Konstruktion der durch den CMV-TO-Promotor regulierbaren Expressionskassetten codierend für die murinen kostimulatorischen Moleküle CD40, CD40L, RANK, RANKL, 4-1BB oder 4-1BBL.	89
Abb. 3.10:	Schematische Darstellung der Insertion der regulierbaren Expressionskassetten mit Genen für kostimulatorische Moleküle in die deletierte E1-Region des adenoviralen Cosmidvektors.	90

Abb. 3.11:	Schematische Darstellung der Proteinstruktur der kostimulatorischen Moleküle der TNF- bzw. TNFR-Superfamilie mit den gefundenen Abweichungen von den jeweiligen GenBank-Sequenzen.	94
Abb. 3.12:	Herstellung der replikationsdefizienten adenoviraler Vektoren, die kostimulatorische Moleküle codieren, nach Transfektion der adenoviralen Cosmid-DNA in 293LP.	98
Abb. 3.13:	Charakterisierung der adenoviralen DNA der rekombinanten Vektoren mit kostimulatorischen Molekülen.	100
Abb. 3.14:	Immunocytochemische Färbungen zum indirekten Nachweis von mCD40 und mCD40L in infizierten A549 Zellen.	101
Abb. 3.15:	Indirekter Nachweis der m4-1BBL-Expression durch immunocytochemische Färbungen infizierter A549 Zellen.	102
Abb. 3.16:	Immunocytochemische Färbungen zum indirekten Nachweis der Expression von mRANK und mRANKL in infizierten A549 Zellen.	103
Abb. 3.17:	Nachweis der Reifung und Infizierbarkeit von dendritischen Zellen.	106
Abb. 3.18:	Expression von HPV-16 L1 und L1/E7 in infizierten murinen dendritischen Zellen.	109
Abb. 3.19:	HPV-16 E7-Expression in infizierten murinen dendritischen Zellen.	110
Abb. 3.20:	HPV-16 L1-Expression in infizierten humanen dendritischen Zellen.	112
Abb. 3.21:	HPV-16 E7-Expression in infizierten humanen dendritischen Zellen.	113
Abb. 3.22:	Effekt des adenoviralen Gentransfers von kostimulatorischen Moleküle auf murine dendritische Zellen.	115
Abb. 3.23:	Analyse der Expression von MHC II, CD80 und CD86 im FACS nach adenoviralem Gentransfer von kostimulatorischen Molekülen in murinen dendritischen Zellen.	119
Abb. 3.24:	Darstellung der in HPV-16 E7 identifizierten H-2D ^b und A2.1-restringierten CTL-Epitope.	121
Abb. 3.25:	Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Vorversuche zur Immunisierung mit Peptid bzw. Protein und anschließender Untersuchung der HPV-16-spezifischen <i>memory</i> T-Zellantwort.	123
Abb. 3.26:	<i>Memory</i> T-Zellantwort gegen die HPV-16 E7 bzw. L1 CTL-Epitope nach Immunisierung von A2.1K ^b -transgenen Mäusen mit den jeweiligen Peptiden bzw. mit E7 Protein.	126
Abb. 3.27:	Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Immunisierungsversuche mit dendritischen Zellen.	128
Abb. 3.28:	Direkte HPV-16 E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort nach Immunisierung mit dendritischen Zellen.	130
Abb. 3.29:	Direkte HPV-16 E7- und L1-spezifische Effektor-T-Zellantwort nach Immunisierung mit dendritischen Zellen.	133

Abb. 3.30:	HPV-16 E7-spezifische <i>memory</i> T-Zellantwort nach Immunisierung mit dendritischen Zellen.	136
Abb. 3.31:	HPV-16 E7- bzw. L1-spezifische <i>memory</i> T-Zellantwort nach Immunisierung mit dendritischen Zellen.	142
Abb. 3.32:	L1-spezifische Antikörperantwort nach Immunisierung mit dendritischen Zellen.	143
Abb. 3.33:	Einfluß der Expression von 4-1BBL auf die durch dendritische Zellen induzierte HPV-16 E7-spezifische T-Zellantwort.	146
Abb. 3.34:	Effekt des Transfers von CD40, CD40L, RANK und RANKL auf die durch dendritische Zellen induzierte HPV-16 E7-spezifische T-Zellantwort.	149
Abb. 3.35:	Einfluß der in T-Zellen exprimierten kostimulatorischen Moleküle CD40L und RANKL bzw. der endogen in dendritischen Zellen exprimierten kostimulatorischen Moleküle CD40 und RANK auf die T-Zellantwort gegen HPV-16 E7 nach Immunisierung mit dendritischen Zellen.	151
Abb. 3.36:	Verstärkung der HPV-16 E7-spezifischen T-Zellantwort durch Koexpression von RANK, RANKL und 4-1BBL in dendritischen Zellen.	153
Abb. 3.37:	Effekt von 4-1BBL auf die Spezifität der Immunantwort im <i>ex vivo</i> IFN γ -ELISPOT.	154

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Proteine von HPV-16 und ihre Funktion.	3
Tab. 1.2:	Oligonukleotid-Primerpaare für die Amplifikation von HPV-16 L1p Δ C, E7mut sowie die Gene der kostimulatorischen Moleküle.	46
Tab. 2.2:	Primer für die Sequenzierung von HPV-16 L1p Δ C, HPV-16 E7mut sowie die Gene der kostimulatorischen Moleküle.	47
Tab. 2.3:	Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele.	57
Tab. 2.4:	Verwendete Antikörper für die immunozytochemischen Färbungen.	59
Tab. 2.5:	Für die FACS-Messung verwendete Antikörper.	60
Tab. 2.6:	Verwendete Peptide, die HPV-16-spezifische CTL-Epitope repräsentieren.	61
Tab. 3.1:	Zusammenfassung der Klonierung der rekombinanten Adenoviren mit HPV-16 Sequenzen.	76
Tab. 3.2:	Erwartete Restriktionsmuster der jeweiligen linearen Adenovirus-DNA oder zirkulären Adenocosmid-DNA nach Doppelverdau mit SmaI und XbaI.	81
Tab. 3.3:	Zusammenfassung der Klonierung der rekombinanten Adenoviren mit kostimulatorischen Molekülen.	93
Tab. 3.4:	Erwartete Restriktionsmuster der jeweiligen linearen Adenovirus-DNA oder zirkulären Adenocosmid-DNA nach Doppelverdau mit SmaI und XbaI.	99
Tab. 3.5:	Zusammenfassung der FACS-Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses der kostimulatorischen Moleküle auf murine dendritische Zellkulturen.	117

1 Einleitung

In der Statistik der Todesursachen ist Krebs in den letzten 50 Jahren in den Industrieländern zunehmend bedeutender geworden. Allerdings liefern die herkömmlichen Behandlungsmethoden, wie Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie, häufig nicht zufriedenstellende Ergebnisse¹, weshalb neue Therapieformen gesucht werden.

Aktivierete endogene oder exogene (virale) Onkogene bzw. inaktivierete Tumorsuppressor-gene sind verantwortlich für die Transformation von normalen Zellen zu malignen Zellen². Tumore entstehen dann durch das progressive Wachstum der transformierten Zellen, wenn sie der Kontrolle des Immunsystems entkommen. Die transformierten Zellen exprimieren qualitativ und quantitativ andere Proteine, die vom Immunsystem als tumorspezifische oder Tumor-assoziierte Antigene erkannt werden können. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, daß dem Immunsystem bei der Tumorentwicklung eine wichtige Kontrollfunktion zukommt³.

Bereits am Ende des 19. Jahrhunderts wurde für diverse Krankheitsbilder, wie Milzbrand, Diphtherie, Typhus und Entzündungen, die Verbindung mit bakteriellen Infektionen nachgewiesen. Aber auch andere Krankheiten und sogar Krebs standen im Verdacht, durch Infektionen mit Krankheitserregern zu entstehen. 1892 entdeckten Iwanowski und Beijerinck unabhängig voneinander Viren (zur Übersicht⁴). Den Zusammenhang zwischen Viren und Tumorerkrankungen beschrieb erstmals Rous 1911, der das in Hühnern tumor-induzierende, später nach ihm benannte, Rous-Sarcom-Virus identifizierte. Neue Erkenntnisse über die molekularen Zusammenhänge der Tumorentwicklung sowie Fortschritte in der Immunologie, Virologie und Molekularbiologie zeigten die Assoziation von humanen Krebserkrankungen mit speziellen Virusinfektionen, z.B. mit dem humanen Papillomavirus (1.1), aber auch dem Hepatitis B-, Hepatitis C- und Epstein-Barr Virus. Die Infektion mit diesen onkogenen Viren ist oftmals persistierend bzw. chronisch, d.h. das Virus bzw. die virusinfizierten Zellen werden vom Immunsystem nicht effektiv eliminiert. Heutzutage werden allgemein 15 bis 20 % aller Krebserkrankungen der Infektion mit Viren unterschiedlicher Familien zugeschrieben⁵.

Die deutliche Zunahme besonders der Virus-assoziierten Krebserkrankungen in immunsupprimierten Patienten deutet auf die wichtige Rolle des Immunsystems bei der Prävention dieser Erkrankungen hin⁶. Die Expression tumorspezifischer Erreger-assoziiierter Antigene könnte als Ziel für immuntherapeutische Ansätze bei einer Vielzahl von Krebserkrankungen dienen⁷. Die Prävention Tumor-assoziiierter chronischer Infektionskrankheiten kann zur Tumorprävention beitragen.

1.1 Papillomaviren und ihr Einfluß auf die Krebsentstehung

Die Papillomaviren wurden erstmals 1907 durch Ciuffo⁸ untersucht. Er beschrieb die Übertragung von Warzen durch zellfrei filtrierte Warzenextrakte. Die erste direkte Beschreibung der Papillomaviren erfolgte 1933 durch Shope⁹, der die Tumore von Kaninchen untersuchte. Diese Tumore an Kopf und Schulter der Tiere bildeten bizarre Formen

(Papillome) aus und beruhen auf einer Infektion mit dem *cottontail rabbit* Papillomavirus⁹. Bei den Papillomaviren handelt es sich um eine große Gruppe untereinander verwandter Viren, die bei zahlreichen höheren Wirbeltieren Warzen induzieren und zudem ein Potential zur Bildung von Tumoren haben. Alle Papillomaviren besitzen ein zirkuläres, doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Größe von etwa 8 kb, das von einer icosahedralen Proteinhülle umgeben ist (Abb. 1.1 I). Das Viruskapsid dieser nicht-umhüllten DNA-Viren besitzt einen Durchmesser von 40 bis 55 nm.

Die Anzahl der bekannten humanen Papillomaviren (HPV) liegt derzeit bei über 100 Typen und wird voraussichtlich in den nächsten Jahren weiter zunehmen^{5,10}. Die HPV wurden aufgrund der Häufigkeit ihres Vorkommens in Läsionen bzw. Karzinomen in sog. *low* und *high risk* Virustypen unterteilt, denen ein niedriges bzw. hohes Risiko zur Induktion einer Krebserkrankung zugeschrieben wird. Diese Einteilung bestätigt sich in der unterschiedlichen Fähigkeit der *low* und *high risk* Typen humane Keratinozyten zu immortalisieren^{11,12}. Zu den *low risk* Typen gehören die meisten der auf der Haut vorkommenden Papillomaviren (z.B. HPV-5, -8, -20)¹³, die bekanntesten und am besten erforschten *high risk* Viren sind HPV-16, -18 und -31, die regelmäßig in Zervix-Krebsbiopsien gefunden werden¹⁴. Die *high risk* Papillomaviren werden überwiegend durch familiäre oder sexuelle Kontakte verbreitet. Sie sind in ca. 80 % aller Tumore im Genitalbereich nachweisbar, und insbesondere Zervixkarzinome (Gebärmutterhalskrebse) sind zu 95 % mit HPV-Transformationen assoziiert^{15,16}. Neben der HPV-Transformation sind mit der Tumorentstehung allerdings noch weitere Risikofaktoren wie beispielsweise Rauchen, orale Kontrazeptiva, UV-Bestrahlung oder chromosomale Instabilitäten assoziiert^{17,18}. Mit der Entdeckung von HPV als Auslöser für Condylomata und Läsionen im Genitalbereich wurden sie zum Modellsystem (1.6) für die Tumovirusforschung und lösten CRPV und bovine Papillomaviren ab, die über Jahre die Objekte der Virus-assoziierten Tumorforschung waren (zur Übersicht¹⁴).

1.1.1 Das Humane Papillomavirus HPV-16

HPV-16 gehört zu den *high risk* Typen der humanen Papillomaviren und wird bereits seit den 80iger Jahren mit der Entstehung von Zervixkarzinomen in Verbindung gebracht. Epidemiologische Studien haben gezeigt, daß die Infektion mit HPV der größte Risikofaktor für die Entwicklung von Zervixkarzinomen ist¹⁸. Das Zervixkarzinom ist weltweit mit 400.000 neuen Fällen pro Jahr²⁰ die dritthäufigste Krebserkrankung bei Frauen¹⁹. In beinahe allen (ca. 99 %) Zervixkarzinomen konnte HPV-DNA detektiert werden, wobei die beiden *high risk* Typen HPV-16 und HPV-18 am häufigsten vertreten waren²¹. Die WHO erklärte die humanen Papillomaviren als Onkogene für Menschen²².

Das Genom von HPV-16 besteht aus einem ringförmigen doppelsträngigen DNA-Molekül mit einer Größe von 7905 bp (Abb. 1.1 I). Das Genom von HPV-16 enthält acht Transkriptionseinheiten (siehe Tab. 1.1), die alle auf einem DNA-Strang lokalisiert sind. Die DNA wird von einem icosahedralen Viruskapsid umgeben und enthält keine Hüllmembran. Der Durchmesser der Viruskapside, die hauptsächlich aus dem L1 Protein zusammengesetzt sind, beträgt 55-60 nm. Die virale DNA ist assoziiert mit Histonen, welche von der Wirtszelle gebildet werden¹⁴.

Tab. 1.1: Proteine von HPV-16 und ihre Funktion (nach Bonne²³)

Virusprotein	Größe [kDa]	Funktion	Lokalisation
E1	68-85	Initiation der viralen DNA-Replikation, ATP-abhängige Helicase-Aktivität, Bildung von Heterodimeren mit E2, Aufrechterhaltung der episomalen Zustands	Zellkern
E2	40-58	Interaktion mit E1 bei der Replikation, Transkriptionsrepressor von E6 und E7	Zellkern
E4	10-17	Wechselwirkung mit Zytokeratingerüst	Zytoplasma
E5	10	Interaktion mit EGF- und anderen Zell-Rezeptoren, Induktion der zellulären Onkogene <i>c-jun</i> und <i>c-fos</i> , Inhibition der Azidifikation der Endosomen	Zytoplasma
E6	16-19	Interaktion mit p53, Induktion der proteolyt. Spaltung von p53, Immortalisierung und Differenzierung der Zellen	Zytoplasma
E7	10-14	Interaktion mit pRB, Immortalisierung der Zellen, Induktion von E2-ähnlichen Zellpromotoren	Zellkern
L1	54-58	Hauptkomponente des Viruskapsids	Zellkern/ Zytoplasma
L2	63-78	Strukturprotein im Kapsid	Zellkern/ Zytoplasma

Papillomaviren sind sehr weit verbreitet, da sie eine Nische nutzen, die für das Immunsystem nur unzureichend zugänglich ist. HPV-16 infiziert das Schichtepithel der Zervix am Übergang von Vagina zu Ektozervix, wobei es durch Läsionen in tiefere Schichten vordringt und die Basalzellen infiziert (Abb. 1.1 II). Der Vermehrungszyklus von HPV-16 läßt sich in eine latente und eine lytische Phase unterteilen, der mit dem Differenzierungsgrad des infizierten Gewebes zusammenhängt. In den noch undifferenzierten Basalschichten erfolgt die Expression der frühen Transkriptionseinheiten E1 und E4²⁴. Die frühen Gene E6 und E7 werden in geringerem Maße exprimiert. Die Proteine der frühen Gene dienen zur Regulation der viralen Transkription und zur Interaktion mit zellulären Proteinen, die für Zellzyklus und -teilung verantwortlich sind. In dieser latenten, nicht-lytischen Phase kommt es nur zu einer limitierten Virusreplikation der episomalen Virus-DNA auf eine Kopienzahl von 50 bis 400 Virusgenome/Zelle. Die Virus-DNA bleibt dort zunächst in einer Ruhephase. Erst wenn die Zellen zur Differenzierung übergehen und sich von den basalen Schichten wegbewegen, wird die HPV-DNA amplifiziert. Mit zunehmender Differenzierung der infizierten Zelle wird die lytische Phase eingeleitet und die späten Gene von HPV 16 (L1 und L2) sowie E4 exprimiert. L1 und L2 bilden die Viruskapside, welche die replizierte Virus-DNA umschließen. Die infektiösen Partikel werden aus den

terminal differenzierten Zellen, die als Hautschuppen in das Lumen der Zervix abgegeben werden, freigesetzt.

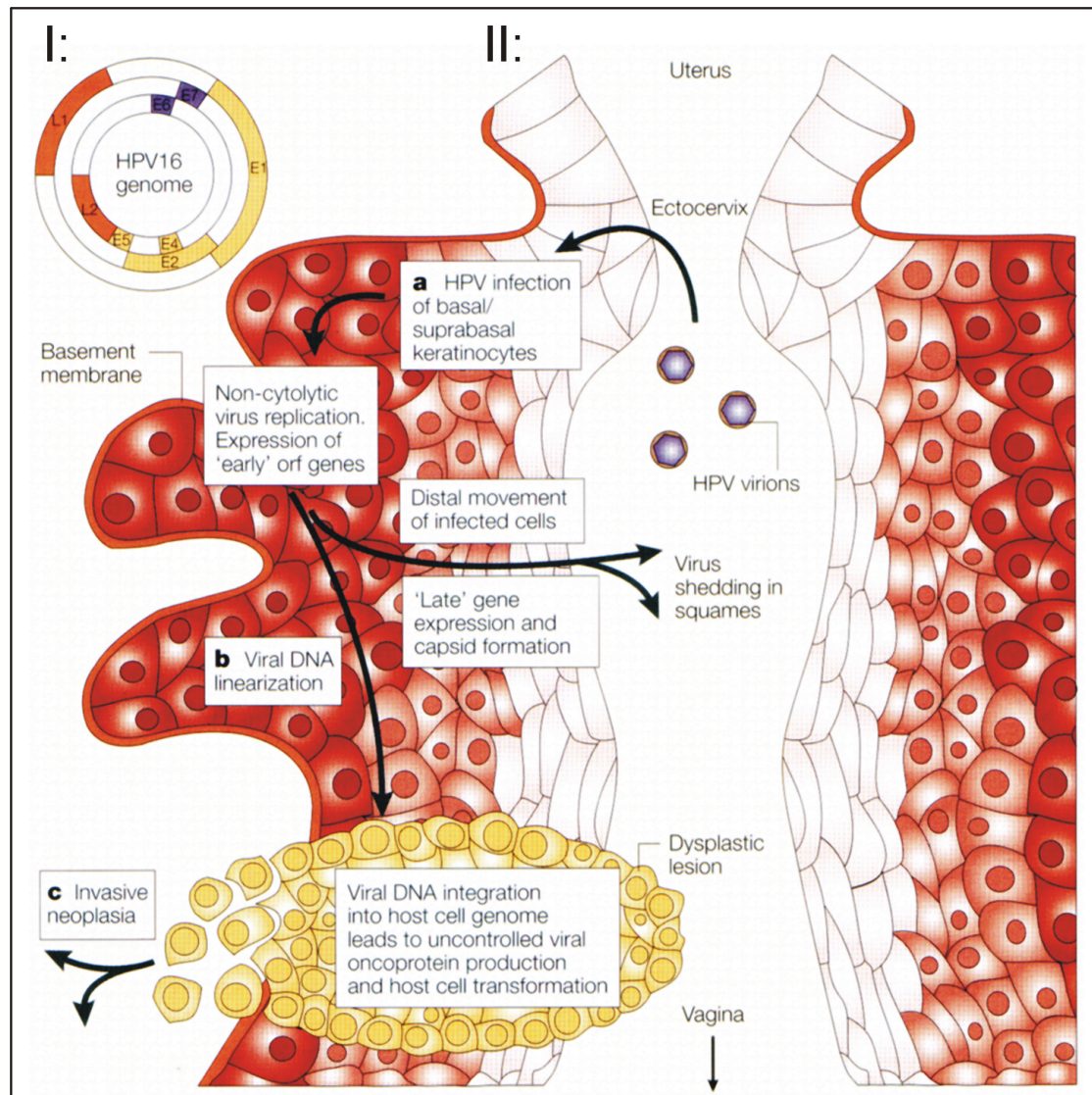


Abb. 1.1: HPV-16 Genom (I) und Infektionszyklus (II). Erläuterung siehe Text. Aus Tindle²⁵.

In seltenen Fällen kommt es zur zufälligen Linearisierung des HPV-Genoms und dessen Integration in das Genom der Zelle²⁶. Wenn durch die Linearisierung die E2-Region zerstört wird, entfällt die E2-vermittelte Repression der E6- und E7-Transkription. Durch die gesteigerte Expression von E6 und E7 in den infizierten Zellen kommt es zur Transformation (Dysplasie). Aufgrund des unkontrollierten Wachstums der transformierten Zellen kann dies zu einer invasiven malignen Tumorerkrankung mit Metastasenbildung in anderen Organen führen.

Die Assoziation von HPV-16 und anderen humanen *high risk* Papillomaviren mit Tumorerkrankungen der Zervix beruht auf ihren Onkogenen E6 und E7. Diese beiden viralen Proteine besitzen die Eigenschaft die Tumorsuppressor-Proteine p53 und pRB zu binden. E6 leitet dann die Degradation von p53 im Proteasom ein, E7 führt zu einer Inaktivierung von pRB^{27,28}. Durch die Funktion von E6 und E7 (siehe Tab. 1.1) kommt es zu Veränderungen von Zyklin-abhängigen Kinasekomplexen, die zur genomischen Instabilität der Zelle führen, wodurch neoplastische Transformationen begünstigt werden²⁹⁻³¹. Es konnte

sowohl *in vivo*^{32,33} als auch *in vitro*^{34,35} gezeigt werden, daß die Expression der beiden Onkogene E6 und E7 für die Immortalisierung sowie für die Aufrechterhaltung des transformierten Zustandes der infizierten Zellen notwendig ist. E7 wird konstitutiv in allen transformierten Zellen des Zervixkarzinoms, aber auch in den noch nicht invasiven Vorstufen des Tumors exprimiert (Abb. 1.1 II). Aus diesem Grund stellt das virale Onkogen E7 ein ideales tumorspezifisches Antigen dar und ist für den Einsatz im Rahmen einer Immuntherapie prädestiniert. Da es sich um ein exogenes bzw. virales Antigen handelt, welches nicht in gesundem Gewebe exprimiert wird, sollten mögliche Probleme einer Immuntherapie durch Autoimmunitätsreaktionen nicht von Bedeutung sein.

Das virale Protein E5 ist ein weiteres Onkogen mit transformierender Eigenschaft³⁶. Die genaue Bedeutung von E5 bei der Entstehung von malignen Erkrankungen ist allerdings nicht klar. Es wird vermutet, daß es nur in der frühen Phase der Infektion aktiv ist, da es bei der Integration der viralen DNA in das zelluläre Genom häufig deletiert wird, und die Integration der Virus-DNA als ein Indiz der Malignität dient³⁷.

Trotz der eindeutigen Assoziation von HPV-16 mit der Entstehung von malignen Erkrankungen der Zervix, entwickeln nur etwa 10 % der infizierten Frauen ein Zervixkarzinom. Bei etwa 50 % der Patientinnen kommt es in einem frühen Stadium zu einer kompletten Remission ohne jegliche Behandlung³⁸⁻⁴⁰. Bei der Protektion gegen das Virus und der Eliminierung der HPV-infizierten Zellen scheint das Immunsystem von großer Bedeutung zu sein, da die Häufigkeit von HPV-Infektionen mit *high risk* Typen und anschließender Progression zu malignen Erkrankungen in immunsupprimierten Patienten, wie z.B. bei AIDS-Patienten, deutlich erhöht ist^{6,41,42}. Aber auch die Einnahme immunsuppressiv wirkender Medikamente nach einer Transplantation erhöht das Risiko HPV-assoziiierter Tumore⁴³. Diese Beobachtungen deuten auf die Kontrollfunktion des Immunsystems bei HPV-induzierten Tumoren hin und lassen die Immuntherapie als neue Behandlungsmethode dieser Tumore vielversprechend erscheinen.

1.2 Immuntherapie zur Behandlung von Tumoren und chronischen Infektionskrankheiten

Das Immunsystem ist ein hoch differenziertes Organsystem, das in der Lage ist, spezifisch gegenüber fremden Antigenen zu reagieren und damit den Organismus zu schützen. Veränderte Zellen wie virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen können durch immunologische Effektorzellen, z.B. zytotoxische T-Zellen, eliminiert werden^{3,44}. T-Zellen verfügen über den T-Zellrezeptor (TCR), der zur spezifischen Erkennung von Antigenen dient. Für die Aktivierung von T-Zellen durch ihren TCR müssen die Antigene zuvor von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) aufgenommen, intrazellulär prozessiert, die entstehenden Peptidfragmente auf dem Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) gebunden und anschließend die MHC/Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche transportiert und präsentiert werden. Im Gegensatz zu anderen Zellen exprimieren professionelle APCs kostimulatorische Faktoren, wie z.B. die beiden kostimulatorischen Differenzierungscluster (CD) CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2). Diese beiden Proteine der B7-Familie werden von dem auf T-Zellen vorkommenden CD28 als Ligand gebunden (siehe Abb. 1.4). Nur bei Vorliegen der kostimulatorischen Signale

führt die Interaktion der APCs mit T-Zellen, die mit ihren T-Zellrezeptor spezifisch MHC/Peptid-Komplexe erkennen, zur Proliferation und Differenzierung der T-Zellen in Effektorzellen; fehlt das kostimulatorische Signal können die T-Zellen anerg werden.

Die Immuntherapie zur Behandlung von Tumoren basiert auf der bereits 1957 von Burnet und Thomas postulierten Hypothese der „Tumor-Immunüberwachung“ (*cancer immune surveillance*)⁴⁵⁻⁴⁷. Diese Hypothese -das Immunsystem ist in der Lage transformierte Zellen zu entdecken und zu eliminieren- wurde aber erst 30-40 Jahre später durch experimentelle Daten bestätigt⁴⁸. Obwohl das häufige Auftreten von Tumorerkrankungen gegen die Existenz einer effektiven Immunüberwachung spricht, zeigt das höhere Risiko von immunsupprimierten Patienten zur Tumorentwicklung^{49,50} die wichtige Kontrollfunktion des Immunsystems und rechtfertigt die Einbeziehung einer Immuntherapie in die Behandlung von Tumorerkrankungen.

Der Immuntherapie liegt zugrunde, daß Tumore bzw. mit einem Erreger-infizierte Zellen spezifische Antigene besitzen, die eine Immunität bewirken können⁵¹. Die Entwicklung ging dabei von humoralen Ansätzen zu Formen mit einem Schwerpunkt auf der zellulären Immunantwort über. Dies basierte auf Erkenntnissen über tumorspezifische und Tumor-assoziierte Antigene, die auf der Zelloberfläche von Tumorzellen exprimiert werden^{52,53}. Generell können die Immuntherapien in aktive und passive Immunisierungsstrategien unterteilt werden. Bei den passiven Strategien wird das Immunsystem z.B. durch die Injektion von tumorspezifischen Antikörpern⁵⁴ oder den adoptiven Transfer von spezifischen T-Zellen⁵⁵ so modifiziert, daß es die transformierten Zellen erkennen und eliminieren kann. Die klinischen Erfolge mit einigen Antikörper-basierenden Immuntherapien führte zu deren Zulassung als therapeutische Arzneimittel in den USA und Deutschland⁵⁴. Bei der aktiven Immuntherapie werden die körpereigenen Komponenten des Immunsystems gegen die therapeutisch relevanten Antigene sensibilisiert. Die aktiven Strategien haben durch die Entwicklung von Methoden zur genetischen Modifikation von Tumorzellen bzw. Komponenten des Immunsystems an Bedeutung gewonnen. Anfangs wurden oft genetisch modifizierte, meist autologe Tumorzellen, die mit Zytokinen oder Genen für kostimulatorische Signale transfiziert wurden, in abgetöteter Form als Vakzine verwendet⁵⁶⁻⁵⁸. Mittlerweile wird davon ausgegangen, daß weder normale Zellen, die mit einem Antigen genetisch modifiziert wurden, noch Tumorzellen in der Lage sind, Antigene korrekt den T-Zellen zu präsentieren und diese zu aktivieren. Die Fähigkeit, naive T-Zellen zu aktivieren, ist den professionellen APCs vorbehalten, weshalb dendritische Zellen (1.3) im Mittelpunkt heutiger immuntherapeutischer Ansätze stehen⁵⁹.

In einer Vielzahl von Studien haben sich genetisch modifizierte Tumorstoffe, zytotoxische T-Zellen und dendritische Zellen als immunstimulatorisch erwiesen. Um eine effektive tumorspezifische Immunantwort zu erreichen, werden mindestens drei synergistische Signale benötigt⁶⁰:

1. TCR auf zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺-Zellen, CTLs) bzw. T-Helferzellen (CD4⁺-Zellen), denen Tumorantigene im Kontext von MHC Klasse I (MHC I) bzw. Klasse II (MHC II)-Molekülen präsentiert werden (Abb. 1.4),
2. antigenunspezifische akzessorische/kostimulatorische Signale, wie z.B. die Interaktion von CD80 oder CD86 mit CD28 auf T-Zellen (Abb. 1.4),

3. proliferative Signale, hervorgerufen durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren, um tumorspezifische Lymphozyten zu rekrutieren.

Obwohl die Entdeckung von tumorspezifischen und Tumor-assoziierten Antigenen ein Meilenstein für die Immuntherapie war, existieren noch einige Hindernisse bei der Entwicklung einer effektiven Immuntherapie. Ein Problem stellt die äußerst niedrige und variable Anzahl an tumorreaktiven T-Zellen dar, weshalb die Amplifikation der tumorreaktiven T-Zellen für eine Immuntherapie mit therapeutischem Nutzen von Bedeutung ist. Ein anderes zu überwindendes Hindernis beruht auf der Eigenschaft von Viren und Tumoren, mittels unterschiedlicher Strategien der Kontrolle durch das Immunsystem zu entgehen. Dazu gehören der Verlust oder die Verringerung von spezifischen Antigenen bzw. der relevanten MHC-Moleküle, eine reduzierte Antigenpräsentation oder unvollständige Signaltransduktion in T-Zellen^{61,62}. Aber auch vom Tumor sezernierte, immunsuppressiv wirkende Faktoren, wie TGF- β (*transforming growth factor*- β) oder Interleukin-10 (IL-10) können die Kontrolle durch das Immunsystem verhindern bzw. reduzieren^{63,64}. So konnte im Falle von Patienten mit malignem Melanom gezeigt werden, daß diese Tumorzellen durch die sezernierten Faktoren gegenüber T-Zellen protektiert und nur schwach immunogen waren⁶⁵. Bei Untersuchungen von tumorspezifischen T-Zellen in Melanomapatienten konnte teilweise eine enorme Vermehrung von antigenspezifischen T-Zellen nachgewiesen werden, die aber nicht zytotoxisch waren. Diese T-Zellen waren selbst nach Stimulation mit Mitogenen nicht in der Lage, Zytokine zu produzieren⁶⁶. Somit wurde unmittelbar durch den Tumor eine Anergie bzw. Toleranz der T-Zellen gegenüber den tumorreaktiven Antigenen induziert. Aber auch die professionellen APCs können durch den Tumor quantitativ und funktionell modifiziert werden. So exprimierten die APCs aus Tumorpatienten keine oder nur unzureichende Mengen an kostimulatorischen Signalen, weshalb tumorspezifische T-Zellen nicht aktiviert werden, sondern in Anergie verfallen⁶⁷. Eine weitere Möglichkeit, der Immunüberwachung zu entgehen, ist eine höhere Vermehrungsrate des Virus bzw. der Tumorzellen gegenüber der Eliminierung durch das Immunsystem.

Die heutigen immuntherapeutischen Ansätze zielen zum einen darauf ab, den Tumor durch die optimale Nutzung der stimulatorischen Eigenschaft der professionellen APCs immunogener zu machen⁶⁸, eine effektivere Stimulation der spezifischen CTLs zu induzieren, und die Strategien des Tumors, der Kontrolle des Immunsystems zu entgehen, zu umgehen. Zum anderen wird versucht die Anergie oder Toleranz gegenüber dem Tumor durch die Stimulation und Expansion von Effektorzellen zu durchbrechen. Dabei konzentrieren sich die gegenwärtigen Bemühungen auf den Einsatz von dendritischen Zellen (1.3) als professionellen APCs, da diese professionellen APCs anscheinend die einzigen Zellen sind, die naive T-Zellen aktivieren können⁶⁹. Die geringe Immunogenität von Tumoren wird durch die Unfähigkeit des Tumors, naive T-Zellen und auch anerge bzw. tolerante T-Zellen zu aktivieren, hervorgerufen. Dies läßt den Einsatz von dendritischen Zellen in der Immuntherapie sinnvoll erscheinen (1.3.8).

1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen wurden erstmals 1973 als kleine distinkte Population von Zellen in der Milz von Mäusen entdeckt und beschrieben⁷⁰. Sie unterscheiden sich phänotypisch deutlich von den bis dahin bekannten anderen professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, wie B-Lymphozyten und Makrophagen. Sie haben eine sternförmige Morphologie, wenig intrazelluläre Organellen und phagozytierten weniger als Makrophagen. Wegen ihrer dendriformen Morphologie sowie der Tatsache, daß sie den bis dahin bekannten Zelltypen nicht zugeordnet werden konnten, sind sie heute als dendritische Zellen bekannt. Steinman postulierte, daß dendritische Zellen an der Induktion primärer Immunantworten beteiligt sind, da sie die zur Antigenpräsentation benötigten MHC II-Moleküle exprimieren. Ein wesentliches Problem bei der Bestätigung dieser Hypothese war die geringe Verfügbarkeit der dendritischen Zellen, da sie nur 1% der Leukozyten ausmachen⁷¹, und die zum damaligen Zeitpunkt noch relativ wenig entwickelten Techniken zur Isolierung, Kultivierung und Identifizierung der Zellen. So konnte erst fünf Jahre nach der Identifikation der dendritischen Zellen gezeigt werden, daß sie effiziente Stimulatoren bei der Aktivierung naiver T-Lymphozyten sind⁷², und weitere 5 Jahre später, daß sie an Abstoßungsreaktionen gegen Organtransplantate beteiligt sind⁷³. Da sie nicht nur die Initiatoren der primären Immunantworten sind, sondern auch die Induktion der zentralen sowie peripheren Toleranz des Immunsystems gegenüber Antigenen kontrollieren, nehmen dendritische Zellen eine zentrale Rolle bei der Regulation des Immunsystems ein.

Mit den Fortschritten, die es ermöglichen, dendritische Zellen in Mengen zu gewinnen, die größere und detailliertere Untersuchungen erlaubten, wurden sie bei vielen Nagern⁵⁹ und in nahezu allen Organen des Menschen nachgewiesen⁷⁴. Dendritische Zellen stellten sich als hoch spezialisierte akzessorische Zellen des Immunsystems dar⁷⁵ und werden heute mit Makrophagen und B-Lymphozyten zu den professionellen APCs gezählt. Da die Stimulation von Lymphozyten durch dendritische Zellen überwiegend auf Zell-Zell-Interaktionen beruht (Abb. 1.4), sind spezifische Oberflächenproteine zur Ausübung ihrer Funktionen (Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen, sowie der Stimulation von T-Zellen) von Bedeutung. Aus diesem Grund werden die spezifischen Oberflächenproteine in Antigenrezeptoren, Adhäsionsmoleküle, kostimulatorische und Antigen-präsentierende Moleküle unterteilt⁷⁶⁻⁷⁸.

Eine weitere Besonderheit der dendritischen Zellen sind, neben ihrer weiten Verbreitung in den unterschiedlichsten Organen, die verschiedenen Reifungs- bzw. Entwicklungsstadien, die miteinander in Verbindung stehen⁵⁹.

1.3.1 Unreife und ausgereifte dendritische Zellen

Wegen ihrer einzigartigen Fähigkeit, naive T-Lymphozyten durch die Expression von kostimulatorischen Signalen zu aktivieren, spielen dendritische Zellen eine zentrale Rolle bei der Auslösung primärer Immunantworten⁷⁹. Im Vergleich zu aktivierten B-Lymphozyten⁸⁰ oder Monozyten⁸¹ sind sie wesentlich potenter bei der Stimulation naiver Lymphozyten. Dendritische Zellen unterscheiden sich von anderen Leukozyten durch ihre charakteristische Morphologie sowie ihrer hohen konstitutiven Expression von MHC II-Molekülen und anderen Oberflächenproteinen. Anhand ihres Vorkommens, ihrer

Differenzierung und ihrer Funktion werden sie in unreife und ausgereifte dendritische Zellen unterteilt⁶⁹ (Abb. 1.2). Diese beiden unterschiedlichen Entwicklungsstadien stellen Zellen des gleichen Zelltyps dar⁵⁹.

Unreife dendritische Zellen kommen in peripheren Geweben vor⁸²⁻⁸⁶. Alle unreifen dendritischen Zellen werden als interstitielle dendritische Zellen zusammengefaßt, da sie morphologische bzw. phänotypische Gemeinsamkeiten besitzen. Für die unreifen dendritischen Zellen der Haut, die bereits 1868 von Langerhans beschrieben wurden, ist der historische Begriff „Langerhans-Zellen“ erhalten geblieben. Ihr Vorkommen und ihre Verteilung in den Geweben und Organen dient als eine Art Netzwerk zur Überwachung des Eindringens fremder Antigene. In den Geweben und Organen nehmen sie durch endozytotische Aktivität fortlaufend sehr effizient Antigene auf (1.3.3). Die Prozessierung der aufgenommenen Antigene (1.3.5) erfolgt in speziellen Kompartimenten durch Proteasen. Nach der anschließenden Beladung der MHC I/II-Moleküle mit den entstandenen Peptidfragmenten erfolgt der Transport der MHC/Peptid-Komplexe auf die Zelloberfläche^{87,88}.

Durch die Anwesenheit bestimmter Stimuli, z.B. eine Infektion in der lokalen Umgebung, wird in den unreifen dendritischen Zellen ein Reifungs- bzw. Differenzierungsprozeß ausgelöst (1.3.4), der zu einer deutlichen Veränderung ihrer Morphologie und Funktion führt. Gleichzeitig mit dem Differenzierungsprozeß zu ausgereiften dendritischen Zellen erfolgt auch die Migration der unreifen dendritischen Zellen zu den lokalen lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten, Tonsillen, Peyersche Plaques).

Im Gegensatz zu unreifen dendritischen Zellen besitzen die in den lymphatischen Organen vorkommenden ausgereiften dendritischen Zellen nicht mehr die Fähigkeit zur effizienten Antigenaufnahme und Prozessierung. Sie kommen als interdigitierende dendritische Zellen in den an T-Lymphozyten reichen Zonen der lymphatischen Organe vor, wo sie durch Zellkontakte effektiv naive T-Lymphozyten stimulieren können⁸⁹ (1.3.6). Durch die Interaktionen der reifen dendritischen Zellen mit den T-Lymphozyten erfolgt neben der Stimulation und Proliferation der T-Lymphozyten mit anschließender Differenzierung in spezifische Effektorzellen und Gedächtniszellen (*memory* T-Zellen) auch eine terminale Differenzierung der dendritischen Zellen. Diese terminale Differenzierung in den lymphatischen Organen, die durch die spezifische Interaktion mit T-Zellen ausgelöst wird, könnte einen regulativen Effekt auf Dauer sowie Stärke der ausgelösten Immunantwort haben⁹⁰ (siehe 1.4).

1.3.2 Entwicklung dendritischer Zellen

Die Herkunft der dendritischen Zellen konnte in den letzten Jahren aufgeklärt werden. Die dendritischen Zellen stammen von haematopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab⁹¹. Die Entwicklung der in der Literatur beschriebenen Subpopulationen von dendritischen Zellen, die sich in ihrem Phänotyp, ihrer Funktion sowie ihrer Lokalisation in den lymphatischen Organen unterscheiden^{69,92}, konnte aber noch nicht eindeutig aufgeklärt werden, da keine spezifischen Marker für die Identifikation der einzelnen Vorläuferstadien der dendritischen Zellen zur Verfügung stehen.

In der Literatur wird die Entwicklung der dendritischen Zellen aus zwei unterschiedlichen Entwicklungslinien postuliert: der myeloiden und der lymphoiden Linie⁹²⁻⁹⁴. Zur

myeloiden Linie gehören die Langerhans-Zellen und die interstitiellen dendritischen Zellen. Die Entdeckung, daß sich die thymischen dendritischen Zellen aus lymphoiden Vorläuferzellen entwickeln^{95,96}, führte zur Benennung als lymphoide Linie. Die thymischen dendritischen Zellen sollen eine Funktion bei der negativen Selektion der Lymphozytenentwicklung haben, indem sie dort körpereigene Antigene (Autoantigene) präsentieren. Erkennt eine T-Zelle mit ihren TCR die präsentierten Autoantigene, wird ein apoptotisches Signal in den T-Lymphozyten induziert. Durch die Funktion der thymischen dendritischen Zellen werden autoreaktive Zellen aus dem T-Zellrepertoire entfernt^{97,98}.

Für die Unterscheidung der lymphoiden Linie von der myeloiden Linie diente in den letzten Jahren vor allem die Expression von CD8 als lymphoider Marker^{99,100}. Kürzlich veröffentlichte Arbeiten haben jedoch gezeigt, daß sowohl die myeloiden als auch die lymphoiden Vorläuferzellen alle bekannten Subpopulationen an reifen dendritischen Zellen generieren können¹⁰¹⁻¹⁰³. Somit scheint CD8 kein geeigneter Marker für die lymphoide Linie zu sein, sondern vielmehr einen Differenzierungsmarker darzustellen, der zur Separation zweier funktionell unterschiedlicher Subpopulationen dendritischer Zellen dienen kann^{104,105}. Um eindeutige Information zu liefern, werden geeignete Methoden zur Untersuchung der Entwicklung *in vivo* benötigt.

1.3.3 Antigenaufnahme

Antigene können von dendritischen Zellen sehr effizient über verschiedene endozytische Prozesse aufgenommen werden, die auf mehreren Transportmechanismen beruhen, und sich in Makropinozytose, Rezeptor-vermittelte Endozytose und Phagozytose einteilen lassen¹⁰⁶.

Die Makropinozytose ermöglicht die unspezifische Aufnahme von Antigenen in gelöster Form¹⁰⁷. Bei der Makropinozytose schnüren sich große Membranbereiche als Endosomen von der Plasmamembran ab, wobei gleichzeitig eine Vielzahl löslicher Proteine in den abgeschnürten Vesikeln mit aufgenommen wird. Die gebildeten Endosomen enthalten wegen der hohen Anzahl von MHC/Peptid-Komplexen auf der Oberfläche der dendritischen Zellen viele MHC/Peptid-Komplexe. Die Endosomen werden u.a. in die MHC II-Kompartimente, die spezielle lysosomale Kompartimente darstellen, transportiert¹⁰⁷. Dort werden die aufgenommenen Antigene prozessiert und nach der Beladung der MHC-Moleküle mit den entstandenen Peptidfragmenten wieder zur Zelloberfläche transportiert, um mit der Plasmamembran zu verschmelzen. Die Makropinozytose wird mit zunehmender Differenzierung der unreifen dendritischen Zellen auf ein Minimum reduziert.

Die als Rezeptor-vermittelte Endozytose bezeichnete Antigenaufnahme erfolgt über spezielle Rezeptoren auf der Zelloberfläche^{107,108}. Dabei dienen z.B. der Mannose-Rezeptor, DEC-205 oder Fcγ-Rezeptoren der Klasse I und Klasse II zur spezifischen Bindung von Antigenen, die anschließend gemeinsam mit den Rezeptoren in die intrazellulären Kompartimente gelangen. Die Rezeptor-vermittelte Endozytose stellt einen sehr selektiven Aufnahme-prozeß dar, mit dem spezifische Antigene aufgenommen werden können. Wie die Makropinozytose wird auch die Rezeptor-vermittelte Endozytose mit zunehmender Differenzierung der unreifen dendritischen Zellen verringert⁸⁶.

Als dritten Mechanismus zur Aufnahme von Viren, Bakterien, sowie apoptotischen und nekrotischen Zellen dient die Phagozytose¹⁰⁹⁻¹¹². Die Phagozytose wird ebenfalls über Fc γ -Rezeptoren und Integrine vermittelt, wodurch die dendritischen Zellen über eine selektive phagozytotische Aktivität verfügen¹⁰⁹. Die Phagozytoserate unreifer dendritischer Zellen ist geringer als die von Makrophagen¹¹³ und nimmt während der Differenzierung zu reifen dendritischen Zellen ab.

Unreife dendritische Zellen nutzen alle endozytotischen Prozesse zur Antigenaufnahme, wohingegen reife dendritische Zellen diese Fähigkeit zur Antigenaufnahme nicht mehr besitzen (Abb. 1.2). Die effiziente Antigenaufnahme unreifer dendritischer Zellen ist auf die Makropinozytose und die Rezeptor-vermittelte Endozytose zurückzuführen. Im Vergleich zu anderen APCs können dendritische Zellen durch diese beiden Prozesse auch geringe Mengen eines Antigens effizient aufnehmen und dem Immunsystem präsentieren¹⁰⁷.

1.3.4 Stimulation, Migration und Aktivierung dendritischer Zellen

Der *in vivo* Ausreifungs- bzw. Differenzierungsprozeß der dendritischen Zellen kann in drei Phasen unterteilt werden, die eng miteinander verbunden sind, und sequentiell durchlaufen werden: Aktivierung, Migration und Wanderung in die lymphatischen Organe. Dieser Prozeß erfordert das Vorhandensein mehrerer Gewebe und Zelltypen.

Der Prozeß beginnt mit der Stimulation der unreifen dendritischen Zellen in den nicht-lymphatischen Organen (Abb. 1.2). Die Stimulation der unreifen dendritischen Zellen kann durch zahlreiche Faktoren erfolgen, die entweder mit den Antigenen aufgenommen werden oder in der lokalen Umgebung vorliegen. So führen z.B. LPS¹¹⁴, bakterielle DNA¹¹⁵ oder doppelsträngige RNA¹¹⁶, die bei der Infektion mit bakteriellen oder viralen Erregern auftreten, zur Stimulation der dendritischen Zellen. Aber auch proinflammatorische Zytokine wie IL-1¹¹⁷ oder TNF- α ¹¹⁸ in der Umgebung stimulieren die Differenzierung der unreifen dendritischen Zellen. Moleküle wie IL-10 und TGF- β hemmen dagegen die Stimulation der dendritischen Zellen¹¹⁹.

Die stimulatorischen Signale bewirken, daß die dendritischen Zellen aus den nicht-lymphatischen Organen über die afferente Lymphe in die lokalen sekundären lymphatischen Organe wandern. Das Festsitzen in den Lymphknoten wird auch als *homing* bezeichnet, da sich *in vivo* markierte, unreife dendritische Zellen nach ihrer Migration in den Lymphknoten wiederfinden lassen¹²⁰. Für diese Wanderung sind insbesondere Adhäsionsmoleküle und spezielle Chemokinrezeptoren, wie CCR-7, von Bedeutung¹²¹. Die in der afferenten Lymphe auffindbare Population von dendritischen Zellen bezeichnet man aufgrund ihrer Morphologie als *veiled cells*, weil diese Zellen schleierhafte Membranausstülpungen aufweisen.

Gleichzeitig mit der Migration zu den lokalen sekundären lymphatischen Organen kommt es zu deutlichen Veränderungen der Morphologie, des Phänotyps und der Funktion der Zellen, die als Reifung der dendritischen Zellen bezeichnet werden. So nimmt die Fähigkeit der Zellen zur Antigenaufnahme (1.3.3) durch die Abnahme des Expressionsniveaus der beteiligten Rezeptoren und durch die Verringerung der Reorganisation des Zytoskeletts für die Phagozytose deutlich ab. Parallel zur Reduktion der Antigenaufnahme und Prozessierung (1.3.5) gelangen verstärkt mit prozessiertem Antigen-beladene MHC I/II-Moleküle

sowie kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86, aber auch Adhäsionsmoleküle (wie z.B. CD58) an die Zelloberfläche der dendritischen Zellen, die zur Stimulation naiver T-Lymphozyten dienen (Abb. 1.2).

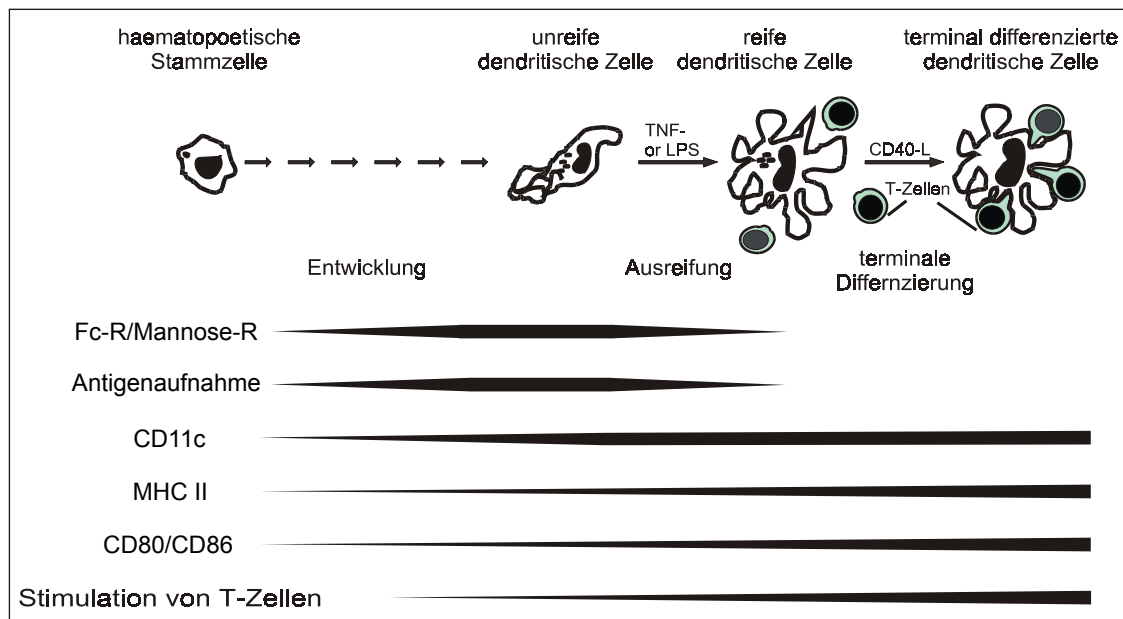


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Differenzierung dendritischer Zellen. Erläuterung siehe Text.

Die sukzessive Reifung der dendritischen Zellen setzt sich in den sekundären lymphatischen Organen weiter fort. Durch die Interaktion der dendritischen Zellen mit den T-Lymphozyten kann es zu einer terminalen Differenzierung der dendritischen Zellen kommen. Vermittelt wird diese Interaktion u.a. durch die Bindung bestimmter Rezeptor/Ligandenpaare wie CD40/CD40L, RANK/RANKL und anderer Mitglieder der TNF- bzw. TNFR-Superfamilie (siehe 1.4). Durch die Verbindung dieser Moleküle erhalten die dendritischen Zellen weitere Differenzierungssignale, die zu einer Steigerung ihrer immunstimulatorischen Kapazität führen. So konnte neben einer verstärkten Expression von CD80 und CD86 auch die Produktion größerer Mengen an Zytokinen, wie IL-12, IL-1, und IL-6, nachgewiesen werden¹²²⁻¹²⁶. Aber auch ein anti-apoptotischer Effekt auf die dendritischen Zellen konnte durch die Verbindung der TNF/TNFR-Paare gezeigt werden, wodurch die Dauer und Effizienz der T-Zellaktivierung verbessert werden kann (1.4).

1.3.5 Antigenprozessierung

Die Prozessierung der aufgenommenen Antigene in Peptidfragmente zur Beladung von MHC I- und MHC II-Molekülen erfolgt auch in dendritischen Zellen getrennt voneinander. Die Beladung der MHC II-Moleküle erfolgt mit Peptidfragmenten, die aus exogenen, durch Endozytose aufgenommenen Antigenen prozessiert wurden. Die mit Peptidfragmenten-beladenen MHC II-Moleküle dienen zur Aktivierung der CD4⁺-Helfer-T-Lymphozyten. Für Aktivierung von zytotoxischen CD8⁺-T-Lymphozyten (CTLs), die besonders für die Eliminierung von viralen Infektion und Tumorzellen von Bedeutung sind^{3,44} dienen mit Peptidfragmente-beladene MHC I-Moleküle. Normalerweise werden die MHC I-Moleküle mit Peptidfragmenten beladen, die aus endogen synthetisierten und prozessierten Antigen stammen^{127,128}. In dendritischen Zellen existiert aber auch ein spezieller

Mechanismus zur Beladung von MHC I-Molekülen mit Peptidfragmenten aus Antigenen exogener Natur^{127,128}.

Die durch Endozytosevorgänge aufgenommenen Antigene (1.3.3) exogener Natur werden zu speziellen lysosomalen Kompartimenten transportiert. Diese multilamellaren, multivesikulären Kompartimente enthalten eine hohe Anzahl von MHC II-Molekülen, und dienen zu deren Beladung^{88,129}, weshalb sie auch als MHC II-Kompartimente bezeichnet werden. Die Proteine werden in den Kompartimenten durch saure Hydrolasen, Proteasen, Lyasen usw. zu Peptidfragmenten mit einer Länge von 12 bis 20 Aminosäuren degradiert. Durch die hohe Dichte an MHC II-Molekülen in der Plasmamembran der dendritischen Zellen werden während der Endozytose auch viele MHC II-Moleküle mitgerissen. Im sauren Milieu des lysosomalen MHC II-Kompartiments verlieren die mitgerissenen MHC II-Moleküle ihre bisherigen Peptidfragmente und können daher mit neuen Peptidfragmenten beladen werden¹³⁰. Die Beladung der MHC II-Moleküle findet während des Rücktransports zur Plasmamembran statt. Nach der Verschmelzung mit der Plasmamembran können die MHC II/Peptid-Komplexe mit den TCR der CD4⁺ T-Helferzellen interagieren.

Die Beladung der MHC I-Moleküle erfolgt normalerweise durch den klassischen endogenen Prozeß, in dem endogen synthetisierte Antigene prozessiert werden. Es existiert aber auch ein exogener Prozeß zur Beladung der MHC I-Moleküle mit prozessierten Antigenen exogener Natur^{127,128}. Bei dem klassischen endogenen Prozessierungsvorgang werden die intrazellulären Proteine im Zytosol zuerst mit Ubiquitin markiert und anschließend durch Proteasomen in Peptidfragmente mit einer Länge von 8 bis 10 Aminosäuren gespalten¹³¹. Die entstandenen Peptidfragmente werden durch ATP-abhängige Transportsysteme (TAP-1/2 Transporter) in das Endoplasmatische Reticulum (ER) befördert, wo die dort synthetisierten MHC I-Moleküle mit ihnen beladen werden. Erst die Bindung des Peptidfragmentes ermöglicht die korrekte Faltung der MHC I-Moleküle. Dies induziert die Freisetzung des MHC I/Peptid-Komplexes vom Calnexin, das unbeladene MHC I-Moleküle im Lumen des ER zurückhält. Die korrekte Konformation und die anschließende Freisetzung vom Calnexin sind die Voraussetzungen für den Transport der MHC I/Peptid-Komplexe zur Plasmamembran. An der Zelloberfläche können die MHC I/Peptid-Komplexe mit den TCR der CTLs interagieren. Durch die Präsentation von Peptidfragmenten intrazellulärer Antigene auf den MHC I-Komplexen unterliegt die Zelle einer ständigen Kontrolle durch CTLs, da im Falle einer Infektion der Zelle mit einem Virus neben den Peptidfragmenten zellulären Ursprungs auch virale Peptidfragmente auf den MHC I-Komplexen präsentiert werden können.

Der exogene Prozeß der Antigenprozessierung zur Beladung der MHC I-Moleküle wird auch als Crosspräsentation bzw. *crosspriming*^{104,132} bezeichnet und stellt eine Ausnahme vom Dogma der Antigenprozessierung. Mit Crosspräsentation ist die Beladung von MHC I-Molekülen mit Peptidfragmenten gemeint, die von exogenen Antigenen stammen und nicht wie im klassischen Prozeß endogener Natur sind. Hierbei gelangen die mittels Endozytose aufgenommenen Proteine bzw. bereits degradierte Peptidfragmente aus den lysosomalen Kompartimenten ins Zytosol¹³³. Vom Zytosol könnten auch die Peptidfragmente von Antigenen exogener Natur über den TAP-Transporter ins Lumen des ER befördert werden und dort auf MHC I-Moleküle geladen werden¹³⁴. Nach dem Transport der MHC I/Peptid-Komplexe zur Plasmamembran können auch Antigene exogener Natur

zur Aktivierung von CTLs führen. Dieser spezielle Prozeß der Antigenprozessierung und Aktivierung von CTLs gegen exogene Antigene findet nur in dendritischen Zellen statt¹⁰⁴. *Crosspriming* ist für die Aufgabe der dendritischen Zellen als Initiatoren primärer Immunantworten sowie als Initiatoren der zentralen und peripheren Toleranz des Immunsystems gegenüber Antigenen von großer Bedeutung^{135,136}, da es die Präsentation von exogenen Antigenen auf MHC I-Komplexen ermöglicht. Durch diesen Prozeß sind dendritische Zellen auch in der Lage Antigene von fremden Zellen, wie z.B. apoptotischen Zellen, CTLs zu präsentieren¹⁰⁹.

1.3.6 Aktivierung von T-Lymphozyten

Dendritische Zellen sind unter den professionellen APCs die effektivsten Stimulatoren⁷⁹⁻⁸¹, was vermutlich auf die 10- bis 100-fach höhere Dichte an MHC I/II-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Zelloberfläche im Vergleich zu B-Lymphozyten oder Monozyten zurückzuführen ist¹³⁷. Die Aktivierung naiver T-Lymphozyten erfolgt in den lymphatischen Organen und erfordert die direkte Zell-Zell-Interaktion dendritischer Zellen mit T-Lymphozyten¹³⁸. Eine effiziente Aktivierung der naiven T-Zellen führt zu deren Proliferation und Expansion mit anschließender Differenzierung in Effektorzellen und Gedächtniszellen (*memory* T-Zellen). Nur das Durchlaufen des gesamten Aktivierungsprozesses ermöglicht die Induktion einer zellulären adaptiven Immunantwort.

Für die Aktivierung von T-Lymphozyten sind zwei unabhängige Signale notwendig¹³⁹. Die spezifische Erkennung von MHC/Peptid-Komplexen auf der Oberfläche der dendritischen Zellen durch den TCR auf der Oberfläche von Lymphozyten liefert das erste Signal (Abb. 1.4). Diese Ligation führt in den T-Zellen durch den TCR-CD3-Komplex zu einer Aktivierung intrazellulärer Tyrosinkinasen der Src-Familie, die wiederum eine intrazelluläre Phosphorylierungskaskade in den Lymphozyten aktivieren. Dieses Signal allein reicht aber noch nicht zur Stimulation der T-Zellen aus. Es wurde sogar gezeigt, daß die alleinige Ligation des TCR die Anergie von T-Lymphozyten zur Folge haben kann, was zur Induktion einer Toleranz gegenüber ein auf den MHC-Komplex präsentierten Peptid führen kann.

Das zweite Signal für die Aktivierung von T-Lymphozyten stammt aus der Verbindung von kostimulatorischen Molekülen (1.4, Abb. 1.4). Dieses zweite, vom Antigen unabhängige Signal wird deshalb auch als kostimulatorisches Signal bezeichnet¹⁴⁰. Gerade in den letzten Jahren nahm die Zahl an identifizierten kostimulatorischen Molekülen (1.4), wie in den Übersichtsartikeln von Chambers¹⁴¹, Pardoll⁶⁸ und Kwon et al.¹⁴² dargestellt, deutlich zu. Das klassische Beispiel kostimulatorischer Moleküle sind CD80 und CD86, die beide zur B7-Familie gehören und in dendritischen Zellen exprimiert werden und mit CD28 auf der Oberfläche von T-Lymphozyten interagieren¹⁴³. Die Bindung von CD28 mit CD80 oder CD86 führt zur Übertragung des Signals auf intrazellulär assoziierte Lck-Tyrosinkinasen, die wie die Src-Kinasen, Phosphorylierungskaskaden in den Lymphozyten einleiten. Durch das Zusammenspiel der durch das kostimulatorische Signal ausgelösten Phosphorylierungskaskade mit der des ersten Signals kommt es zur Proliferation und Aktivierung der T-Lymphozyten.

Für die Aktivierung der naiven T-Zellen sind neben MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen aber auch Adhäsionsmoleküle von Bedeutung, da sie für die Ausbildung der Zellcluster zur Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen verantwortlich sind¹⁴⁴. Adhäsionsmoleküle, wie CD54 (ICAM-1), CD58 (ICAM-3) oder CD11a (LFA-1), werden benötigt, um den Zellkontakt zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen zu stabilisieren und die Dauer der Zell-Zell-Interaktion zu verlängern. Dies ist von Bedeutung, da der TCR wegen seiner Struktur nur eine geringe Affinität zum jeweiligen MHC-Komplex aufweist. Die Adhäsionsmoleküle sind für die Stimulation der T-Lymphozyten von Bedeutung, jedoch nicht am Signaltransduktionsprozeß beteiligt.

Es wurde gezeigt, daß einige hundert MHC/Peptid-Komplexe bis zu 20.000 T-Zellrezeptoren auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten aktivieren können¹⁴⁵. Die gleichzeitige Verbindung der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 mit CD28 führt zur deutlichen Verstärkung des Aktivierungssignal, da die Anzahl der zu aktivierenden T-Zellrezeptoren zur Stimulation der T-Zellen durch die lokale Zunahme an Kinasen und anderen Komponenten des Signaltransduktionsprozesses reduziert ist¹⁴⁶. Die Verbesserung der Aktivierung von T-Zellen durch kostimulatorische Moleküle ist daher für den therapeutischen Nutzen einer Immuntherapie interessant (1.3.8, 1.4). Die intensive Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen führt neben der Aktivierung der T-Lymphozyten aber auch zu einer Aktivierung und terminalen Differenzierung der dendritischen Zellen (1.3.4).

1.3.7 *In vitro* Kultivierung und Charakterisierung von murinen dendritischen Zellen

Aufgrund der niedrigen Anzahl von dendritischen Zellen im Gewebe, wurde seit ihrer ersten Identifikation an Anreicherungs- und Kultivierungsverfahren gearbeitet. Inzwischen gibt es bei der Maus verschiedene Möglichkeiten zur Gewinnung von dendritischen Zellen, wobei bei den meisten Verfahren die Stimulation mit *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) eine zentrale Rolle spielt^{147,148}. Die Charakterisierung der dendritischen Zellen erfolgt unter anderem durch die Analyse der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle. Ein isolierter spezifischer Marker, der nur murine dendritische Zellen aller Reifungsstadien erkennt, existiert nicht, weshalb die Expression von CD11c als spezifischer Marker dient¹⁴⁹. Da CD11c auch auf einzelnen Subpopulationen von Lymphozyten vorkommt¹⁵⁰, werden Kombinationen von Oberflächenproteinen analysiert. Neben der eindeutigeren Charakterisierung durch zusätzliche Oberflächenmarker können aber auch Informationen über den Differenzierungsgrad der dendritischen Zellen gewonnen werden. So exprimieren unreife dendritische Zellen in hohem Maße die für die Antigenaufnahme benötigten Fcγ-Rezeptoren^{151,152}. Dagegen werden die MHC I/II-Moleküle in unreifen dendritischen Zellen nur schwach bis mäßig exprimiert¹⁵³, ebenso wie die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie CD40¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Durch die Differenzierung der unreifen dendritischen Zellen (1.3.1) ändert sich auch die Expression einiger Oberflächenmoleküle. Die Expression der Fcγ-Rezeptoren wird in reifen dendritischen Zellen verringert, wohingegen die Expression von MHC I, MHC II, CD80, CD86 und CD40 zunimmt¹⁵⁶.

Die *in vitro* Kultivierungsmethode, welche die höchsten Ausbeuten verspricht, ist die Isolierung und Kultivierung von Knochenmarkszellen für sechs bis acht Tage^{110,157}. In der

Literatur wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von GM-CSF mit und ohne Interleukin 4 (IL-4) gearbeitet; auch die Kultivierungszeiten variieren. Bisher konnte mit keinem dieser Protokolle eine völlig homogene Population von murinen dendritischen Zellen gewonnen werden. Die Zugabe von IL-4 führte zu einer mikroskopisch homogenen Population von dendritischen Zellen, die sich jedoch in der Expression von MHC II unterscheidet.

Eine Weiterentwicklung des Standardprotokolls von Inaba et al.¹²⁹, zur Gewinnung muriner dendritischer Zellen aus Knochenmarksvorläuferzellen, stellt das Protokoll von Lutz et al.¹⁵⁸ dar. Durch die verlängerte Kultivierungsdauer von acht bis zwölf Tagen, die geringere Zelldichte, die Reduzierung der GM-CSF-Dosis ab Tag 10 sowie die fehlende Depletion von Erythrozyten und Lymphozyten wurden dendritische Zellen mit einer Reinheit von bis zu 95% generiert. Die Zellkulturen an den Tagen 10 bis 12 stellten eine heterogene Population aus unreifen und reifen dendritischen Zellen dar. In der Arbeit von Lutz et al.¹⁵⁸ wurde die Charakterisierung anhand der Stärke der MHC II-Expression, dem Vorhandensein von CD11c und dem Nachweis der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 sowie des Adhäsionsmoleküls CD54 vorgenommen. Reife dendritische Zellen wurden dadurch definiert, daß sie große Mengen an MHC II und an kostimulatorischen Molekülen exprimierten. Eine weitere Ausreifung der Zellen konnte durch den Zusatz von LPS oder TNF α induziert werden. Allerdings ist dieser Schritt nicht unbedingt notwendig, da auch ohne weitere Ausreifung eine effektive Immunantwort induziert werden kann¹⁵⁹.

1.3.8 Immuntherapie mit dendritischen Zellen

Der immuntherapeutische Einsatz von *ex vivo* generierten dendritischen Zellen zielt darauf ab, die dendritischen Zellen so zu verändern, daß sie spezifische Antigene prozessieren und als MHC/Peptid-Komplexe auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Es ist gezeigt worden, daß dendritische Zellen, die Tumorantigene präsentieren, äußerst potent zytotoxische T-Zellen aktivieren können¹⁶⁰. Für den immuntherapeutischen Einsatz von dendritischen Zellen stehen zahlreiche *ex vivo* Methoden zur Beladung mit den Antigenen (Pulsen) zur Verfügung. Die einfachste Methode stellt das Pulsen der dendritischen Zellen mit tumorspezifischen Peptiden dar¹⁶¹. Dieser Ansatz mit tumorspezifischen Antigenen ist jedoch nur in seltenen Fällen möglich, da für viele Tumore keine spezifischen Antigene beschrieben sind¹⁶², und die Gefahr besteht, daß sich Tumore durch Mutationen in den spezifischen Antigenen dem immunologischen Angriff entziehen. Das Pulsen mit tumorspezifischen Peptiden bewirkt die extrazelluläre Bindung an MHC Klasse I-Molekülen auf der Zelloberfläche. Ein weiterer Nachteil ist die erforderliche Kenntnis über die präsentierten Peptidfragmente und deren Bindung an MHC-Moleküle, weshalb diese Methode nicht bei Patienten mit unterschiedlichen MHC-Typen angewendet werden kann.

Durch das Pulsen mit tumorspezifischen Proteinen¹⁶³, können auch noch unbekannte antigene Determinanten im Protein berücksichtigt werden, weshalb es sich auch bei Patienten mit unterschiedlichen MHC-Typen eignet¹⁶⁴. Beim Pulsen mit Tumorlysaten¹⁶⁵ wird das gesamte Repertoire an potentiellen Antigenen einer Tumorzelle genutzt, erfordert aber die operative Gewinnung größerer Mengen von Tumormaterial bzw. dessen Vermehrung *in vitro*¹⁶⁶. Auch die Fusion von dendritischen Zellen mit Tumorzellen¹⁶⁷ ist möglich. Die

komplexe Zusammensetzung der Tumorlysate stellt aber auch einen Nachteil dar, da auch viele Antigene von gesunden Zellen in den Tumorlysaten enthalten sind, wodurch theoretisch die Möglichkeit zur Induktion einer Autoimmunität besteht¹⁶⁸.

Eine weitere *ex vivo* Methode zum Pulsen von dendritischen Zellen, die sich für unterschiedliche MHC-Typen und sich auch für unbekannte Antigene eignet, ist die Transduktion von DNA¹⁶⁹ oder RNA¹⁷⁰, welche entsprechende Antigene codiert. Bei der Verwendung von tumorspezifischer mRNA (oder cDNA) reicht die Entnahme weniger Tumorzellen, deren mRNA amplifiziert werden kann. Die DNA bzw. RNA wird aufgenommen, exprimiert, die resultierenden Proteine prozessiert und auf MHC-Molekülen präsentiert. Eine tumorspezifische RNA kann durch subtraktive Hybridisierung mit RNA aus gesundem Gewebe angereichert werden, um die Konzentration nicht-tumorspezifischer Antigene zu senken¹⁷¹. Durch die über einen längeren Zeitraum andauernde Expression der Antigene bei einer genetischen Modifikation sollte die Präsentation der tumorspezifischen Peptide im Vergleich zum Pulsen mit Peptid bzw. Protein über einen längeren Zeitraum erfolgen¹⁷², da der natürlichen Metabolismus der MHC-Moleküle zeitlich limitiert ist. Ein Nachteil der *ex vivo* genetischen Modifikation von dendritischen Zellen ist die geringe Effizienz des Transfers. Da sich dendritische Zellen durch physikalische, nicht-virale Systeme nicht effizient transfizieren lassen¹⁷³, wurden virale Vektoren etabliert, wobei adenovirale Vektoren (1.5) sich als sehr gute Vektoren für den Gentransfer in dendritische Zellen erwiesen. Unabhängig vom Ursprung der dendritischen Zellen wurden Effizienzen zwischen 80 und 100% beschrieben sowie die Initiation einer spezifisch gegen das Antigen gerichteten Immunantwort dokumentiert¹⁷⁴⁻¹⁷⁷.

Ein mögliches Konzept einer Immuntherapie mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen zeigt Abb. 1.3. Die Strategie läßt sich folgendermaßen zusammenfassen: Von einem Patienten ohne effektive Immunantwort gegen einen Tumor oder ein Pathogen werden durch *in vitro* Kultivierungsmethoden dendritische Zellen gewonnen. Im nächsten Schritt werden die dendritischen Zellen *ex vivo* z.B. durch adenovirale Vektoren (1.5) genetisch modifiziert, so daß sie therapeutisch anwendbare Antigene exprimieren. Die exprimierten tumorspezifischen bzw. mit dem Virus-assoziierten Antigene werden in den dendritischen Zellen prozessiert und auf MHC I/II-Molekülen dem Immunsystem präsentiert. Durch den Einsatz von multicistronischen Expressionskassetten oder durch die Koinfektion mit Vektoren, die unterschiedliche Antigene codieren, können auch mehrere spezifische Antigene gleichzeitig in den dendritischen Zellen exprimiert werden, um die Effizienz der Therapie zu erhöhen bzw. die Gefahr zu verringern, daß der Tumor durch Mutation von Einzeldeterminanten der Immunantwort entkommt. Nach der Immunisierung mit den genetisch modifizierten dendritischen Zellen soll im Patienten durch die Aktivierung, Expansion und Differenzierung spezifischer T-Zellen zu Effektorzellen eine effektive Immunantwort initiiert werden, die zu einer gezielten Eliminierung des Tumor bzw. Virus führt.

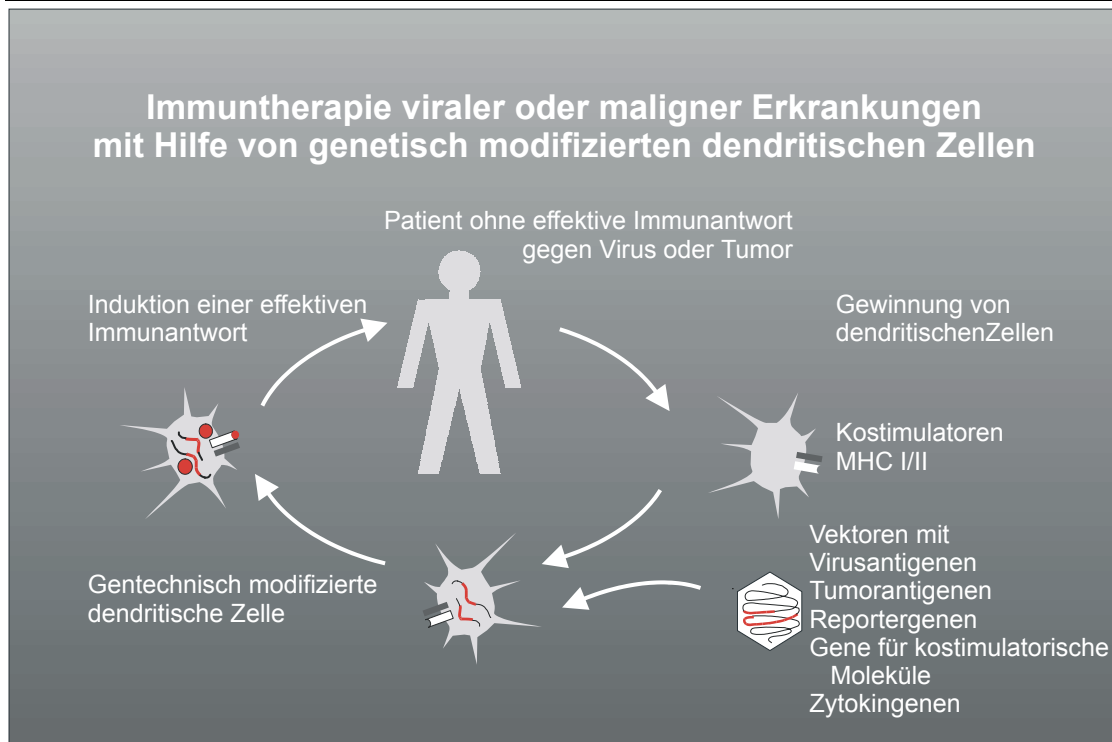


Abb. 1.3: Schema einer Immuntherapie mit dendritischen Zellen

Besonders vielversprechend sieht der therapeutische Erfolg von Krebsvakzinen bei Virus-assoziierten Tumoren wie z.B. dem Zervixkarzinom (1.1) aus¹⁷⁸. In den Fällen, in denen der Tumor nicht auf einen Virus beruht, müssen aber mögliche Nachteile einer Immuntherapie, wie die Schädigung von gesundem Gewebe durch Autoimmunität, beachtet werden¹⁷⁹. Vielleicht wäre bei diesen Tumoren ein gewisser Grad an Autoimmunität der Preis für eine effektive therapeutisch wirksame Immuntherapie.

Bei einer Immuntherapie mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen (Abb. 1.3) bleiben zwei Probleme bestehen: Erstens müssen spezifische Antigene identifiziert werden, gegen die eine Immunantwort induziert werden soll. Das zweite Problem ist die Induktion einer effektiven Immunantwort in einer Situation, in der das Immunsystem möglicherweise durch die Strategien des Tumors, der Immunüberwachung zu entgehen, tolerant oder anerg gegen die relevanten Antigene ist, so daß keine effektive Immunantwort ausgelöst werden kann. Um die immunologische Toleranz oder Ignoranz zu durchbrechen und eine effektive Immunantwort zu erzeugen, muß die bereits vorhandene immunstimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen weiter verbessert werden. Durch die gezielte Verwendung von kostimulatorischen Signalen, wie z.B. durch den Transfer von Genen für Mitglieder der TNF- bzw. TNFR-Superfamilie (1.4) zusätzlich zum Antigen, könnte die stimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen weiter gesteigert werden.

1.4 Tumor-Nekrosis-Faktor- (TNF-) Superfamilie und TNF-Rezeptor- (TNFR-) Superfamilie

Für die Initiation einer zellulären T-Zellantwort ist die Interaktion zwischen professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, wie z.B. dendritischen Zellen, und T-Zellen von großer Bedeutung. Diese Interaktion beruht auf einer Vielzahl von unterschiedlichen

Membran-assoziierten Molekülen bzw. Rezeptoren, so daß praktisch alle Signale, die eine T-Zelle erhält, von der Zellmembran ausgehen. Wie bereits unter 1.3.6 beschrieben, sind für die Aktivierung von naiven T-Lymphozyten zwei unabhängige Signale notwendig¹³⁹. Das erste Signal erhalten die T-Lymphozyten nach der spezifischen Erkennung von MHC/Peptid-Komplexen auf der Oberfläche der dendritischen Zellen durch ihren T-Zellrezeptor (TCR) (Abb. 1.4). Das zweite Signal stammt aus der Interaktion von kostimulatorischen Rezeptor/Liganden-Molekülen. Es dient vor allem der qualitativen und quantitativen Kontrolle der Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen. Anfang der 90er Jahre wurde CD28 als erstes kostimulatorische Molekül auf T-Lymphozyten entdeckt^{180,181}. Die Bindung von CD28 mit CD80 (B7-1) oder CD86 (B7-2), die beide zur B7-Familie gehören und in dendritischen Zellen exprimiert werden, stellt das klassische Beispiel für kostimulatorische Signale dar (Abb. 1.4). In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl von weiteren kostimulatorischen Signalen identifiziert, die bei der Interaktion von dendritischen Zellen mit T-Lymphozyten von Bedeutung sind und einen Effekt auf die Immunantwort haben^{68,141,182}. Wegen des positiven Effekts auf die Immunantwort sind die kostimulatorischen Signale besonders interessant zur Verbesserung der Immunisierungseffizienz von dendritischen Zellen in Immuntherapien⁶⁸. Durch den gezielten Einsatz kostimulatorischer Signale soll das stimulatorische Potential der dendritischen Zellen optimiert werden.

Die kostimulatorischen Signale können in drei Gruppen unterteilt werden: B7-Familie, TNFR- bzw. TNF-Superfamilie und Zytokine. Die zentrale Rolle der Mitglieder der B7-Familie und ihrer Liganden sowie der Zytokine soll im Rahmen dieser Einleitung nicht näher betrachtet werden und es sei auf umfassende Übersichtsartikel verwiesen^{68,141,182}. Die TNFR- und TNF-Superfamilie sind eine ständig wachsende Gruppe von Transmembranmolekülen¹⁴². Bereits sehr früh wurde der Einfluß der TNF/TNFR-Paare auf die Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Zellen entdeckt¹⁸³. Die Mitglieder der TNF-Superfamilie (z.B. TNF, CD40L, RANKL, 4-1BBL, Ox40L und FasL) sind trimere Transmembranproteine vom Typ II (Abb. 1.4, Abb. 3.11). Sie kommen Membran-assoziiert oder nach proteolytischer Spaltung als lösliche Proteine vor, wobei beide Formen aktiv sind¹⁸⁴. Die trimere Proteine der TNFR-Superfamilie sind Transmembranproteine vom Typ I und werden nach ihrer intrazellulären Domäne in zwei Subgruppen unterteilt: Die TNFR-Subgruppe mit Fas und TNFR1 enthält eine *death domain* (DD) in der intrazellulären Domäne und die Mitglieder werden auch als *death receptors* bezeichnet, da ihre Aktivierung über spezielle Adaptermoleküle und Caspase-8 zur Apoptose der Zelle führen¹⁸⁴. Dagegen enthalten z.B. CD40, RANK (*receptor activator of NF- κ B*), 4-1BB und Ox40, die zur zweiten TNFR-Subgruppe, gehören keine DD und induzieren über Signaltransduktionsketten mit diversen TNF-assoziierten Faktoren (TRAFs) die Aktivierung des nukleären Faktors κ B (NF- κ B) und der c-Jun-N-terminalen-Kinase (JNK), was die Proliferation und das Überleben der Zellen fördert^{184,185}. Das Expressionsprofil der TNF/TNFR-Paare¹⁴² sowie ihre Bedeutung bei der Regulation des Immunsystems, einschließlich der Aktivierung von T-Zellen und dem Überleben von dendritischen Zellen, deutet auf eine besondere Bedeutung dieser Rezeptor/Ligandenpaare bei der Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen, und damit auf einen unmittelbaren Einfluß auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort hin¹⁸². Somit könnten einige TNF/TNFR-Paare

zur Verbesserung des therapeutischen Nutzens einer Immuntherapie mit dendritischen Zellen führen, was eine eingehendere Untersuchung rechtfertigt.

In den folgenden Kapiteln soll die besondere Bedeutung der TNF/TNFR-Paare CD40/CD40L, RANK/RANKL und 4-1BB/4-1BBL auf das Immunsystem, speziell dendritische Zellen und T-Zellen, erläutert werden.

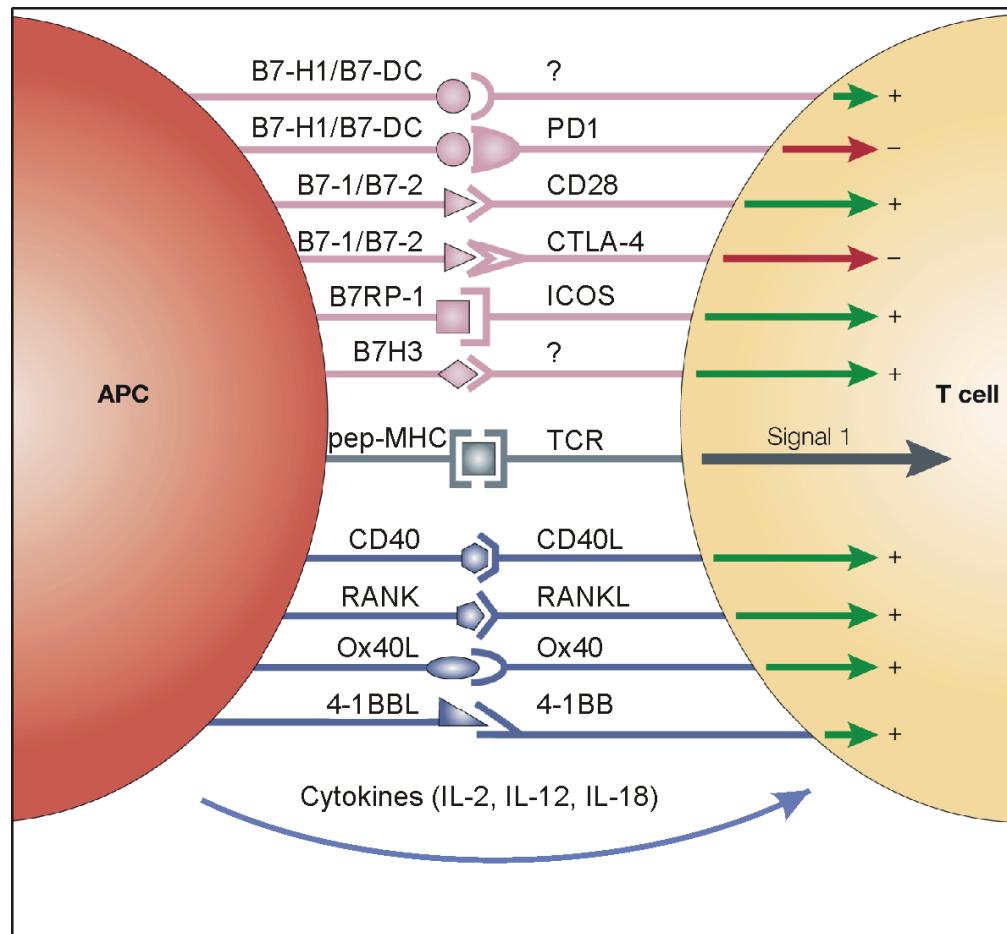


Abb. 1.4: Schematische Übersicht der Interaktion zwischen professionellen APC und T-Zellen zur Aktivierung von T-Zellen und Initiation einer T-Zellimmunantwort. Erläuterung siehe Text. Modifiziert aus Pardoll⁶⁸.

1.4.1 Effekt von CD40/CD40L auf dendritische Zellen und T-Zellen

Das bekannteste und am besten untersuchte TNF/TNFR-Paar mit Einfluß auf die zelluläre Immunantwort sind CD40 und CD40L¹⁸⁶. CD40 wird sowohl in unreifen und reifen dendritischen Zellen als auch in anderen professionellen APCs (B-Lymphozyten und Makrophagen) exprimiert (siehe Abb. 1.4). Die Expression von CD40 kann unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. einer lokalen Entzündungsreaktion, auch in Endothelzellen induziert werden. Nach Stimulation mit dem spezifischen Antigen wird die Expression von CD40L in aktivierten CD4⁺-T-Lymphozyten induziert¹²⁴, jedoch kann CD40L auch in anderen Zelltypen nachgewiesen werden. Dieses relative breite Expressionsprofil deutet darauf hin, daß die Funktion von CD40/CD40L nicht nur auf dendritische Zellen und T-Zellen beschränkt ist. So sind CD40/CD40L für die T-Zellabhängigen B-Zellantworten, wie Bildung von Keimzentren, Isotyp-Umschaltung und Affinitätsreifung, von großer Bedeutung^{187,188}.

Während der Interaktion von dendritischen Zellen mit CD40L-exprimierenden CD4⁺-T-Zellen, beeinflußt die CD40/CD40L-Stimulation den Differenzierungszustand der dendritischen Zellen, indem es die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie CD58, und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 erhöht^{189,190}. Aber auch die Anzahl der MHC/Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche der dendritischen Zellen wird durch CD40/CD40L induziert, ebenso wie ein anti-apoptotischer Effekt durch die Induktion des Apoptose-Suppressors Bcl-x_L^{69,76}. Die Produktion von Zytokinen, wie IL-8 und IL-12, in dendritischen Zellen wird durch CD40/CD40L aktiviert.

Wegen dieser positiven Effekte der CD40/CD40L-Stimulation auf die dendritischen Zellen wird sie in vielen *in vitro* Kultivierungsprotokollen als Differenzierungsstimulus genutzt, um reife, stimulatorische dendritische Zellen zu generieren. Daß der Effekt von CD40/CD40L auch zu einer Verbesserung des immunstimulatorischen Potentials der dendritischen Zellen führt, konnte anhand der Erhöhung der induzierten zytotoxischen T-Zellantworten gezeigt werden^{122,191,192}. Auch die Aktivierung und Expansion von CD4⁺-T-Lymphozyten ist von CD40/CD40L abhängig¹⁹³. Der therapeutische Nutzen von CD40/CD40L für immuntherapeutische Ansätze konnte bereits in zahlreichen Studien untersucht werden. Dabei wurde demonstriert, daß CD40/CD40L die Effizienz von anti-tumoralen Vakzinen erhöht und sogar eine tumorspezifische T-Zelltoleranz durchbrechen kann^{194,195}.

1.4.2 Einfluß von RANK/RANKL auf dendritische Zellen und T-Zellen

RANK (*receptor activator of NF-κB*) wurde aus einer dendritischen cDNA Bibliothek identifiziert und weist innerhalb der TNFR-Superfamilie die höchste Homologie zu CD40 auf¹⁹⁶. Es ist ebenfalls bekannt als ODF-R (Rezeptor des *osteoclast differentiation factor*, ODF) bzw. TRANCE-R (Rezeptor von *TNF-related activation-induced cytokine*, TRANCE). Detailliertere Analysen zeigten eine ubiquitäre Expression der RANK mRNA in dendritischen Zellen, während die Lokalisation des Rezeptors auf der Zelloberfläche nur in reifen dendritischen Zellen erfolgt¹⁹⁷. Der Ligand von RANK (RANKL) konnte nach Bindung an den Rezeptor nachgewiesen werden und gehört zur TNF-Superfamilie¹⁹⁶. Die Expression von RANKL ist auf T-Zellen, T-Zelllinien und lymphoiden Geweben restringiert und kann nach Stimulation des T-Zellrezeptors in aktivierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten induziert werden¹²⁴. Dieses spezielle Expressionsprofil von RANK/RANKL deutet auf eine wichtige Rolle dieses TNF/TNFR-Paares bei der Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen (siehe Abb. 1.4) und damit auf einen unmittelbaren Einfluß auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort hin. Die zentrale Bedeutung von RANK/RANKL bei der Osteogenese soll im Rahmen dieser Einleitung nicht näher betrachtet werden und es sei auf einem umfassenden Übersichtsartikel verwiesen¹⁹⁸.

Die Aktivierung von RANK auf dendritischen Zellen durch den auf T-Zellen exprimierten Liganden RANKL induziert die Expression der Zytokine (IL-12, IL-15, IL-1, IL-6), wodurch die Aktivierung von T-Zellen verbessert werden kann¹²⁴. Auch die Initiation der Apoptose wird in dendritischen Zellen inhibiert, da nach der Bindung von RANKL an RANK über diverse TRAFs die Signaltransduktion zur Aktivierung von NF-κB und JNK erfolgt¹⁹⁹⁻²⁰². Der anti-apoptotische Effekt von RANK/RANKL auf dendritische Zellen steht im direkten Zusammenhang mit der Induktion der Expression von Bcl-x_L, einem

bekannten Apoptose-Suppressor²⁰³. Dagegen wird durch RANK/RANKL der Differenzierungsgrad der dendritischen Zellen nicht verändert, da die Expressionsintensitäten der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 und anderer Oberflächenproteine (MHC II, CD54) unverändert bleiben¹⁹⁷. Der anti-apoptotische Effekt von RANK/RANKL ermöglicht eine verlängerte Interaktion zwischen der dendritischen Zelle und der T-Zelle, die neben der Produktion von Zytokinen das immunstimulatorische Potential der Zellen beeinflussen kann²⁰³. So konnte *in vitro* eine Steigerung der T-Zellaktivierung mit RANKL behandelten dendritischen Zellen gezeigt werden^{196,197}. Auch *in vivo* konnte die Überlebensrate der dendritischen Zellen durch RANK/RANKL erhöht werden und die durch die dendritischen Zellen induzierte CD4⁺-T-Zellantwort sowie die Produktion der Zytokine IFN γ und IL-4 gesteigert werden²⁰⁴.

Zwar besitzen RANK/RANKL keinen Einfluß auf die Proliferation oder das Überleben von T- und B-Zellen²⁰³, es konnte jedoch aus *knock-out* Experimenten eine zentrale Rolle von RANK/RANKL für die Lymphknoten-Organogenese und Lymphozytenentwicklung nachgewiesen werden²⁰⁵. RANKL^{-/-}-Mäuse entwickelten zum einen schwere Defekte in der frühen Entwicklung von T- und B-Lymphozyten, zum anderen fehlten ihnen sämtliche Lymphknoten, während die Entwicklung dendritischer Zellen nicht beeinträchtigt wurde²⁰⁵.

1.4.3 Einfluß von 4-1BB/4-1BBL auf dendritische Zellen und T-Zellen

Die Expression des TNFR-Superfamilienmitglieds 4-1BB wurde nach Stimulation des T-Zellrezeptors in aktivierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten nachgewiesen²⁰⁶. Sein Ligand 4-1BBL wird in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad in dendritischen Zellen exprimiert²⁰⁷. Durch dieses Expressionsmuster mit dem TNFR-Molekül in T-Zellen hat die 4-1BB/4-1BBL-Stimulation im Gegensatz zu CD40/CD40L (1.4.1) und RANK/RANKL (1.4.2) einen direkten Effekt auf die T-Zellpopulation (Abb. 1.4). So konnte durch 4-1BB/4-1BBL ein anti-apoptotischer Effekt in T-Zellen nachgewiesen werden, der im direkten Zusammenhang mit der Induktion der Expression des Apoptose-Suppressors Bcl-x_L und IL-2 steht²⁰⁸. Die Aktivierung von 4-1BB durch 4-1BBL führt zur Steigerung primärer und sekundärer CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellantworten, der Entwicklung und Aktivität von zytotoxischen T-Zellen sowie der anti-tumoralen Immunität²⁰⁹⁻²¹². Dieser Effekt von 4-1BB/4-1BBL ist jedoch nicht auf die Modifikation der zytotoxischen Kapazität der einzelnen T-Zellen zurückzuführen²¹³. Im Rahmen immuntherapeutischer Ansätze konnte die Effizienz von tumorspezifischen Peptid-Vakzinen durch die Kombination mit agonistischen 4-1BB-spezifischen Antikörpern gesteigert und sogar die immunologische Toleranz gegenüber Tumoren durchbrochen werden²¹². Die 4-1BB/4-1BBL-Stimulation ist von besonderer Bedeutung für die T-Zellstimulation unter limitierenden, suboptimalen Antigenbedingungen²¹¹. Wegen dieser Effekte wurden 4-1BB/4-1BBL für die Entwicklung effektiverer Vakzine attraktiv.

Durch die Entdeckung, daß 4-1BB auch in unreifen dendritischen Zellen exprimiert wird und deren Differenzierung zu reifen dendritischen Zellen induziert^{214,215}, hat 4-1BB/4-1BBL als kostimulatorisches Signal an Bedeutung gewonnen, wie im Übersichtsartikel von Kwon et al.²¹⁶ zusammengefaßt ist. Das einzigartige Expressionsprofil von 4-1BB/4-1BBL unterscheidet sie von allen anderen Mitgliedern der TNF/TNFR Superfamilie.

Wie CD40 und RANK beeinflußt die Aktivierung von 4-1BB den Differenzierungszustand der dendritischen Zellen, indem es die Produktion der Zytokine IL-6 und IL-12 sowie die Zunahme der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 induziert^{214,215}. Im Gegensatz zu CD40 und RANK, deren Liganden nur in T-Zellen exprimiert werden, scheint die 4-1BB-Stimulation von unreifen dendritischen Zellen durch Zell-Zell-Kontakte mit reifen 4-1BBL-exprimierenden dendritischen Zellen zu erfolgen²¹⁵. Die anschließende Differenzierung in reife dendritische Zellen ermöglicht wieder die konventionelle 4-1BB/4-1BBL-Stimulation der T-Zellen²¹⁵. Somit ermöglicht dieses TNF/TNFR-Paar die Modifikation des Differenzierungsgrad der dendritischen Zellen ohne die Interaktion mit T-Zellen. Ein solcher „autokriner“ Aktivierungsmechanismus der dendritischen Zellen könnte neben der konventionellen 4-1BB/4-1BBL-Stimulation von T-Zellen durch dendritischen Zellen von sehr großer Bedeutung für die Biologie der dendritischen Zellen sowie der Regulation und Kontrolle des Immunsystems sein. Auf Grund dieser möglichen Rolle von 4-1BB/4-1BBL für die Aufrechterhaltung sowie Dauer einer spezifischen Immunantwort sind neue Erkenntnisse über dieses Rezeptor/Liganden-paar auch für immuntherapeutische Ansätze wichtig.

1.4.4 Bedeutung der TNF/TNFR-Paare für die Immuntherapie

Die positiven Effekte der kostimulatorischen TNF/TNFR-Paare CD40/CD40L, RANK/RANKL und 4-1BB/4-1BBL beruhen auf der Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen (siehe Abb. 1.4). Neben der Anwesenheit des Antigens fördert insbesondere die Expression kostimulatorischer Moleküle und die Produktion von Zytokinen, die das Wachstum und die Differenzierung von T-Zellen beeinflussen, das stimulatorische Potential der dendritischen Zellen. Diese Eigenschaft der TNF/TNFR-Paare könnte die Fähigkeit der dendritischen Zellen zur Aktivierung naiver tumorspezifischer T-Zellen bzw. anerger oder toleranter T-Zellen im Falle einer immunologischen Toleranz gegenüber dem Tumor verbessern und zur Entwicklung von Immuntherapien mit therapeutischen Nutzen führen.

Neben der Modifikation des Differenzierungszustands und der Produktion von Zytokinen hat aber auch die anti-apoptotische Wirkung der TNF/TNFR-Paare einen positiven Effekt auf die immunstimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen. Durch den anti-apoptotischen Effekt, der zur einem längeren Überleben der dendritischen Zellen führt, wird auch die Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen verlängert und die Möglichkeit zur Initiation einer effektiven Immunantwort verbessert^{196,197}. Durch den anti-apoptotischen Effekt von 4-1BB/4-1BBL auf T-Lymphozyten besteht auch die Möglichkeit zur unmittelbaren Modifikation der Apoptose in T-Zellen²⁰⁸.

Die Tatsache, daß die Aktivierung eines TNF/TNFR-Paares die Expression der anderen TNF/TNFR-Paare induziert¹⁹⁶, deutet auf eine entscheidende Rolle der TNF/TNFR-Paare in der Aktivierungskaskade für eine T-Zell-vermittelte Immunantwort hin. So reduziert die Blockierung von RANK/RANKL nicht die Aktivierung von T-Zellen zu einem frühen Zeitpunkt nach einer Virusinfektion, jedoch im späteren Verlauf der Infektion²¹⁷. Für RANK/RANKL konnte zudem gezeigt werden, daß sie eine CD40/CD40L-unabhängige T-Zellantwort bei bestimmten viralen Infektionen hervorrufen²¹⁷. Dies deutet auf die Relevanz einzelner TNF/TNFR-Paare bei der Infektion mit unterschiedlichen Pathogenen hin, jedoch scheint der Einfluß der TNF/TNFR-Paare auf einige Aspekte des

Immunsystems komplexer zu sein, da der Verlust eines TNF/TNFR-Paares durch die Funktion anderer Paare kompensiert werden kann¹⁹⁸.

Aufgrund der in diesem Kapitel beschriebenen Effekte von CD40/CD40, RANK/RANKL bzw. 4-1BB/4-1BBL erscheint die Modifikation der stimulatorischen Eigenschaft der dendritischen Zellen zur Verbesserung der Immunisierungseffizienz bei Antigenen, die nur schwach immunogen sind bzw. gegen die eine immunologische Anergie oder Toleranz vorliegt, vielversprechend.

1.5 Adenovirale Vektoren für den Gentransfer

Die Grundlagen aller gentherapeutischen Ansätze sind neben der Identifikation der therapeutisch nutzbaren Gene, effiziente und reproduzierbare Gentransfersysteme, um die Behandlung oder Prävention von Krankheiten zu ermöglichen. Es existieren dabei grundsätzlich zwei Arten von Gentherapien, *ex vivo* oder *in vivo*. Bei den *ex vivo* Ansätzen werden die Zielzellen außerhalb des Organismus modifiziert und dann in den Patienten zurückgegeben. Bei der *in vivo* Methode wird der Vektor mit den therapeutischen Genen direkt in das jeweilige Gewebe injiziert. Die *ex vivo* Methode ist auf leicht isolierbare Zellen beschränkt und setzt eine erfolgreiche Reimplantation voraus. Sie hat im Vergleich zu dem *in vivo* Transfer den Vorteil, daß sich das Problem der Spezifität des Gentransfers nicht stellt und die potentiellen Gentransfermethoden effizienter sind.

Generell unterscheidet man bei den verfügbaren Methoden für den Gentransfer in Mammalienzellen zwischen viralen und nicht-viralen Vektorsystemen. Bei allen Gentransfermethoden ist das Einschleusen des gewünschten Gens in das Zielgewebe der limitierende Schritt. Für die Entwicklung eines effizienten Gentransfersystems sind verschiedene Gesichtspunkte zu berücksichtigen. So sollte das ausgewählte Vektorsystem einen zielgerichteten und wirksamen Transfer des Transgens gewährleisten. Aber auch andere Aspekte, wie die Dauer bzw. Effizienz der Expression des Transgens, mögliche schädigende Einflüsse auf die transduzierte Zelle sowie Sicherheitsrisiken, sind von Bedeutung für die Auswahl des Vektorsystems. Die nicht-viralen Gentransfersysteme, wie die direkte Injektion der DNA, Elektroporation, die Verwendung von Genpistolen oder die Anwendung von Liposomentechniken, besitzen den generellen Nachteil einer geringeren Effizienz. Dagegen besitzen sie gegenüber viralen Systemen den Vorteil, daß sie nicht von bekannten Pathogenen abgeleitet sind. Bei der Verwendung der effizienteren viralen Systeme sind jedoch noch weitere Aspekte wie Toxizität, Immunogenität, Wirtsspektrum sowie onkogene Wirkung oder die Integration in das Wirtsgenom von Bedeutung und schränken die Anwendung bestimmter viraler Systeme für einige Problemstellungen ein. Aus praktischen Gründen können zudem Sicherheitsfragen im Umgang mit viralen Systemen, die Herstellung von viralen Vektoren in hohen Titern sowie die Qualitätskontrolle der produzierten Vektoren eine Rolle spielen. Aus diesem Grund konzentriert sich die gegenwärtige Entwicklung sowie Weiterentwicklung viraler Systeme für gentherapeutische Ansätze auf replikationsdefiziente Systeme, die sich von Retroviren, Adenoassoziierten Viren, Vakziniaviren, Herpesviren und Adenoviren ableiten²¹⁸⁻²²¹. Die Auswahl eines bestimmten viralen Vektorsystems hängt dabei von den jeweiligen biologischen Eigenschaften des Virus sowie der therapeutischen Anwendung ab.

Replikationsdefiziente adenovirale Vektoren haben sich als sehr effiziente Vektoren für die genetische Modifikation von dendritischen Zellen erwiesen¹⁷⁴⁻¹⁷⁷. Die folgenden Abschnitte werden sich daher mit adenoviralen Vektoren sowie der Entwicklung eines effizienten Systems zur Herstellung adenoviraler Vektoren für den Gentransfer in dendritischen Zellen beschäftigen.

1.5.1 Biologie des Adenovirus

Die Kenntnisse über die Biologie der Adenoviren sind in einem Übersichtsartikel von Shenk zusammengefaßt worden²²².

Die Adenoviren, die beim Menschen akute Respirationserkrankungen verursachen, wurden erstmals 1953 isoliert und charakterisiert^{223,224}. Bis heute umfaßt die Familie der Adenoviridae über 100 Mitglieder, die eine große Zahl von Zelltypen unterschiedlicher Spezies infizieren können. Alle Adenoviren besitzen ein lineares doppelsträngiges DNA-Genom (Abb. 1.6), das von einer icosahedralen Proteinhülle mit einem Durchmesser von 70-100 nm (Abb. 1.5) umgeben ist. Beim Menschen sind zur Zeit 47 Serotypen beschrieben, die in sechs Subgruppen A bis F gegliedert werden. Die meisten adenoviralen Vektoren basieren auf dem Adenovirus Typ 5, der zur Subgruppe C gehört. Onkogene Eigenschaften der Adenoviren sind beim Menschen nicht bekannt.

1.5.1.1 Struktur des Adenoviruskapsids

Die Viruskapside der Adenoviren bestehen aus DNA (13 % der Partikelmasse) und Proteinen (87 % der Partikelmasse), jedoch keinen Membranen oder Lipiden (Abb. 1.5). Das Viruskapsid setzt sich aus 252 Untereinheiten zusammen. Die Kapsomere werden in Hexons und Pentons unterteilt (240 Hexons und 12 Pentons im Kapsid). Wie schematisch in Abb. 1.5 dargestellt, sind noch andere virale Proteine in den Adenoviruskapsiden enthalten.

Die Pentons enthalten das Fiberprotein, welches charakteristisch für das Adenoviruskapsid an den Ecken des Icosaeders herausragt.

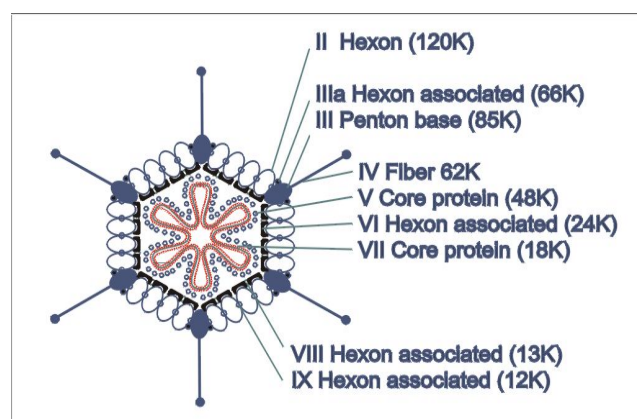


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des Adenoviruskapsids. Die Adenoviren gehören zur Gruppe der nicht-umhüllten DNA-Viren. Das Viruskapsid besteht hauptsächlich aus Hexon- und Penton-Kapsomeren, die die doppelsträngige, lineare virale DNA umschließen. Die Fiberproteine der Penton-Kapsomere sind für die Adsorption an die Wirtszelle von Bedeutung.

Das *core* Protein (V) ist das Terminal-Protein, das kovalent an einem 5'-Ende des viralen DNA-Genoms gebunden ist und für die Replikation der viralen DNA benötigt wird. Es

wurde indirekt bereits 1973 wegen seiner Fähigkeit, die Zirkularisierung der DNA zu vermitteln, entdeckt²²⁵.

1.5.1.2 Organisation des Genoms der Adenoviren

Das adenovirale Genom besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNA mit einer Größe von etwa 36 kb. Das Adenovirusgenom (Abb. 1.6) wird konventionsgemäß so dargestellt, daß das E1A-Gen am linken Ende liegt und das Genom in 100 Einheiten unterteilt wird. Die Enden des Genoms weisen jeweils ein *inverted terminal repeat* (ITR) auf. In jedem dieser ITRs liegt ein Replikationsursprung (*origin of replication*). Zusätzlich ist innerhalb der ersten vierhundert Basenpaare des linken Endes des adenoviralen Genoms eine *cis*-wirkende Verpackungssequenz lokalisiert, welche die Interaktion der Virus-DNA mit den Kapsidproteinen während des Zusammenbaus neuer Adenoviruspartikel ermöglicht.

Das relativ komplexe Genom der Adenoviren besitzt mehrere Transkriptionseinheiten (Abb. 1.6), die in zeitlichen Clustern exprimiert werden. Die fünf frühen (*early*) Transkriptionseinheiten (E1A, E1B, E2, E3 und E4) sowie die zwei verzögert frühen Einheiten (IX und IVa2) werden vor Beginn der Replikation exprimiert. Dagegen wird die späte Transkriptionseinheit, die in fünf späte mRNA-Familien prozessiert wird, erst nach Beginn der Replikation exprimiert.

In der infizierten Zelle werden zuerst die terminalen E1A- und E4-Gene exprimiert, die dann zu der Expression der anderen frühen Transkriptionseinheiten, der beiden verzögerten und der späten Transkriptionseinheit führen. Die Komplexität des Adenovirusgenoms beruht aber neben der zeitlichen Clusterung auch auf der Mannigfaltigkeit der exprimierten Proteine, die durch alternatives Spleißen oder die Wahl verschiedener Polyadenylierungsstellen entstehen, so daß jede Transkriptionseinheit zu mehreren mRNAs führt.

Allgemein gilt, daß die frühen sowie verzögert frühen Transkriptionseinheiten Proteine codieren, die zur Regulation der viralen und zellulären Aktivität dienen, und die späte Transkriptionseinheit die Hüllproteine kodiert. Während die frühen Transkriptionseinheiten von sechs verschiedenen Promotoren aus transkribiert werden, werden die mRNAs für die Hüllproteine von einem Promotor, den *major late* Promotor, kontrolliert.

Das E1A-Gen codiert zwei Proteine, welche die Transkription der adenoviralen Gene aktivieren und die Wirtszelle dazu veranlassen, in die S-Phase des Zellzyklus einzutreten. Die Modulation des Zellzyklus durch die E1A-Proteine erfolgt durch die Degradation zellulärer Komplexe, die aus verschiedenen Mitgliedern der pRB-Familie, verschiedenen E2F-Untereinheiten sowie Zyklinen mit assoziierten Kinasen bestehen, und für die Regulation des Zellzyklus benötigt werden.

Die zwei Proteine der E1B-Transkriptionseinheit interagieren mit den E1A-Proteinen, indem sie das Zellwachstum und den Eintritt in die S-Phase induzieren. Das 55kD große E1B-Protein besitzt eine den Zellzyklus modulierende Funktion, indem es mit dem zellulären Tumorsuppressor-Protein p53, das im Zellzyklus den Übergangspunkt in die S-Phase reguliert, interagiert. Durch die Bindung des E1B-Proteins an p53 wird die p53-vermittelte Transkription von zellulären Genen blockiert, wodurch es zum Verlust der normalen p53-Aktivität und der damit verbundenen Kontrollfunktion für den Zellzyklus kommt.

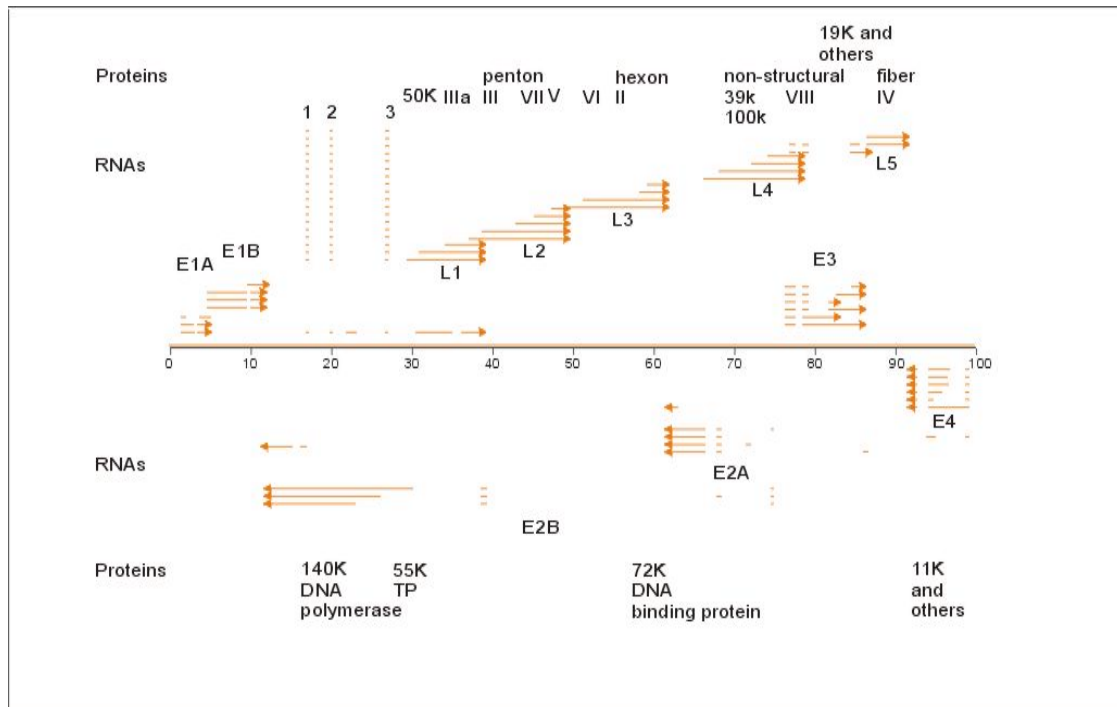


Abb. 1.6: Schematische Organisation des Genoms von Adenovirus 5. Konventionsgemäß wird das 36kb große Genom in 100 Einheiten unterteilt. Die Pfeile beziehen sich auf die primären Transkripte. Erläuterungen über die viralen Genprodukte sowie ihrer Funktion siehe Text.

E2 codiert das Terminal-Protein (55 kDa), eine DNA-Polymerase (140 kDa Protein) sowie ein DNA-Einzelstrang-bindendes Protein, die alle an der Replikation der Virus-DNA beteiligt sind. Die E3-Transkriptionseinheit codiert Proteine, die z.B. durch die Blockierung des MHC-Transportes an die Plasmamembran zur Modulation der Immunantwort des Wirtes gegen die Infektion beteiligt sind. Die E3-Proteine sind für die Replikation nicht essentiell, sondern supprimieren die Immunantwort des infizierten Organismus gegen die Adenovirusinfektion. E4 codiert eine Vielzahl von Proteinen, die eine Reihe von unterschiedlichen Funktionen bei der Regulation der Transkription adenoviraler Gene, dem mRNA-Transport und der viralen DNA-Replikation besitzen.

Die effiziente Expression der späten Genprodukte erfolgt erst nach dem Beginn der viralen DNA-Replikation. Alle späten Genprodukte sind in einer codierenden Region zusammengefaßt und werden bei der Transkription als ein einzelnes, sehr langes Transkript abgelesen. Dieses über 29.000 Nukleotide lange Transkript wird anschließend in wenigstens 18 mRNAs prozessiert, die aufgrund der verwendeten Polyadenylierungsstellen in fünf Familien (L1 bis L5) unterteilt werden.

1.5.1.3 Infektionszyklus von Adenovirus 5

Durch die Bindung des Fiberproteins an die Oberfläche der Zelle beginnt die Infektion. Ein Rezeptor für das Fiberprotein ist noch nicht eindeutig bestimmt. Bislang wurden als Rezeptoren die MHC I $\alpha 2$ -Domäne²²⁶ und der Coxsackievirus/Adenovirus-Rezeptor (CAR)²²⁷ identifiziert, wobei die Bindung an CAR mit einer deutlich höheren Affinität erfolgt²²⁸. Die Internalisierung des adsorbierten Adenovirus erfolgt normalerweise über Rezeptor-vermittelte Endozytose. Adsorption und Internalisierung stellen einen Zweikomponentenprozeß dar, der neben der Interaktion des Fiberproteins mit dem geeigneten Rezeptor auch die Interaktion des Penton-Kapsomers mit $\alpha_v\beta_3$ - oder $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen auf

der Oberfläche der Wirtszelle erfordert. Der genaue Mechanismus, der zu der Initiation der Rezeptor-vermittelten Endozytose führt, ist unklar, es muß aber ein sehr effizienter Internalisierungsprozeß sein, da 80 % bis 85 % der adsorbierten Viren internalisiert werden. Die anschließende Penetration erfolgt rasch, denn 10 Minuten nach der Anheftung befinden sich die Viren bereits in den Endosomen. Über 90 % der Viren verlassen die Endosomen innerhalb von 5 Minuten. Die Absenkung des pH-Wertes in den Endosomen führt dabei zu einer Veränderung der Virushülle, die für die Freisetzung des Viruspartikels in das Zytoplasma der Zelle benötigt wird. Dieser Schritt ist durch die Absenkung des pH-Wertes und durch proteolytische Degradation mit einem teilweisen Abbau des Virions verbunden. Der Transport der Viruspartikel vom Zytoplasma zum Zellkern erfolgt wahrscheinlich mit Hilfe von Mikrotubuli²²⁹. Ungefähr 40 Minuten nach der Penetration können Viruspartikel am Kernporenkomplex mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden. Vermutlich findet am Kernporenkomplex die Freisetzung des linearen Adenovirusgenoms aus dem Viruspartikel in den Zellkern statt. So haben 40 % der internalisierten Viren nach 120 Minuten ihre DNA von den Hexon-Kapsomeren getrennt.

Die frühen Ereignisse des Infektionszyklus, wie Adsorption, Penetration und Expression der frühen Gene, finden schnell nach der Interaktion des Virus mit der Wirtszelle statt. Die Genprodukte der frühen Gene aktivieren die Expression der anderen adenoviralen Gene und die Replikation der Adenovirus-DNA. Aber sie modulieren auch Zellzyklus und Apoptose der infizierten Zelle sowie die anti-viralen Maßnahmen des Wirtes. Die Fähigkeit der Adenoviren, den Zellzyklus der infizierten Zelle zu modulieren und sogar ruhende Zellen zum Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus zu verleiten, ist bereits lange bekannt²²². Das E1A-Gen spielt hierbei eine besondere Rolle, da es die wichtigsten aktivierenden Proteine codiert und die erste Transkriptionseinheit darstellt, die nach Freisetzen der Virus-DNA in den Zellkern exprimiert wird. Ohne die Aktivierung von E1A kann der Vermehrungszyklus nicht fortgesetzt werden. Mit dem Beginn der viralen DNA-Replikation sind die frühen Ereignisse des Infektionszyklus abgeschlossen. Bei HeLa Zellen wurde festgestellt, daß die frühen Ereignisse 5 bis 6 Stunden dauern und der gesamte Infektionszyklus 20 bis 24 Stunden. Nach dem Beginn der adenoviralen DNA-Replikation beginnt die späte Phase des Infektionszyklus mit der Expression der späten Gene, die durch den *major late* Promotor kontrolliert wird. Dieser Promotor ist in den frühen Phasen des Infektionszyklus nur äußerst schwach aktiv und erst eine Kaskade von Ereignissen führt zu seiner Aktivierung. Die Akkumulation der durch die späten Gene codierten Strukturproteine sowie die virale DNA-Replikation induziert den Zusammenbau der Viruspartikel in der infizierten Zelle. Dabei wird zuerst ein leeres Viruskapsid aus den Hexon- und Penton-Kapsomeren gebildet. In das gebildete Prä-Kapsid wird die adenovirale DNA verpackt. Die Erkennung der Interaktion zwischen DNA und Kapsid erfolgt durch die im linken ITR enthaltene Verpackungssequenz. Die beteiligten Proteine sind bislang noch nicht identifiziert worden, aber das Terminal-Protein scheint hierbei von Bedeutung zu sein. Der DNA-Verpackungsmechanismus ist gerichtet und beginnt mit dem linken Ende der adenoviralen DNA. Die Freisetzung der produzierten Viruspartikel erfolgt am Ende des Infektionszyklus durch die Lyse der infizierten Zelle.

1.5.2 Vorteile adenoviraler Vektoren in der Gentherapie

Rekombinante adenovirale Vektoren wurden erstmals 1985 hergestellt und basieren auf den Adenovirus Serotypen 2 oder 5, die zur Subgruppe C gehören. Die Infektion mit Adenoviren der Subgruppe C führte in der Regel nur zu milden Erkrankungen der Atemwege²³⁰ und ist beim Menschen nicht onkogen. 1993 wurden rekombinante Adenoviren erstmalig zur Behandlung der Cystischen Fibrose gentherapeutisch eingesetzt²³¹.

Neben der geringen Pathogenität und der fehlenden onkogenen Eigenschaften der Adenoviren bieten adenovirale Vektoren im Vergleich zu anderen viralen Vektoren aber auch noch andere Vorteile^{230,232}: Die Adenoviren besitzen ein sehr breites Wirtsspektrum, weshalb sie eine Vielzahl an unterschiedlichen Zelltypen, einschließlich nicht-teilende und ausdifferenzierte Zellen, effizient infizieren können. Da ihr Genom vollständig sequenziert und auch viele der viralen Proteine gut charakterisiert sind, läßt sich das adenovirale Genom relativ einfach mit konventionellen molekularbiologischen Methoden manipulieren. Genomische Umstrukturierungen sind bei Adenoviren selten und auch die Insertion fremder Gene bleibt nach zahlreichen viralen Replikationsrunden noch erhalten. Die Adenoviren sind sehr stabil und bei der Viruspräparation lassen sich leicht sehr hohe Titer von bis zu 10^{12} PFU/ml erreichen^{231,233}. Da das adenovirale Genom meistens episomal in der infizierten Zelle verbleibt und somit nicht dauerhaft das Genom der Wirtszelle verändert^{231,234}, bieten adenovirale Vektoren eine sehr hohe, jedoch nur transiente Transgen-Expression.

Ein wesentlicher Nachteil ist, neben der Tatsache, daß in über 85 % der adulten Menschen neutralisierende Antikörper gegen die häufig vorkommenden Serotypen existieren, ihre hohe Immunogenität. Durch die direkte Injektion adenoviraler Vektoren kann es zu Entzündungsreaktionen mit toxischen Nebenwirkungen kommen²³⁵⁻²³⁷. Die Expression viraler Gene bzw. die in den Viruspartikeln enthaltenen viralen Proteine können zur Induktion einer zellulären Immunantwort gegen adenovirale Antigene führen, welche die Eliminierung der adenoviral transduzierten Zelle zur Folge hat²³⁸ und die Wirksamkeit bei erneuter Administration reduziert²³⁹. Um dieses Problem der hohen Immunogenität zu lösen, wurden mehrere virale Gene aus dem adenoviralen Genom deletiert, was zu vielfältigen und teilweise differierenden Ergebnissen führte²⁴⁰. Auch die Deletion aller viralen Gene bei den sogenannten *gutless* oder *high-capacity* Vektoren^{241,242} verhindert nicht vollständig die Immunogenität der Adenoviren.

Ein anderer Weg das Problem der immunogenen Wirkung der adenoviralen Vektoren zu umgehen, ist ihre *ex vivo* Anwendung, um die Menge der viralen Proteine zu reduzieren. So haben Untersuchungen in murinen sowie humanen Modellen gezeigt, daß adenovirale Vektoren mit hoher Effizienz dendritische Zellen infizieren, das Transgen exprimiert wird und durch die *ex vivo* modifizierten dendritischen Zellen eine spezifische Immunantwort gegen das Transgen induziert wird^{174,176,243,244}. Durch diese *ex vivo* Modifikation konnte weder eine toxische Nebenwirkung noch eine gegen die adenoviral transduzierten dendritischen Zellen gerichtete Immunantwort nachgewiesen werden^{243,244}. Somit stellen adenovirale Vektoren ein effizientes Gentransfersystem für die Modifikation dendritischer Zellen dar und durch die *ex vivo* Infektion können die generellen Nachteile dieses viralen Vektorsystems, wie Toxizität und Immunogenität, umgangen werden. Auch die transiente Transgen-Expression könnte im Rahmen einer Immuntherapie von Vorteil

sein, da so die theoretisch mögliche Induktion einer immunologischen Toleranz gegen das Transgen vermieden wird.

1.5.3 Herstellung adenoviraler Vektoren

Für den Transfer von therapeutischen Genen in die Zielzellen muß die Möglichkeit bestehen, die rekombinante DNA in das adenovirale Genom zu integrieren, um einen gleichbleibend effizienten Transfer zu gewährleisten. Bei Adenovirus Typ 5 liegt die maximale Verpackungskapazität des Kapsids bei ca. 105 % des Wildtyp-Genoms und entspricht einer Kapazität von etwa 1.8 kb zusätzlicher DNA²⁴⁵. Um die Transportkapazität für die Bereitstellung großer bzw. polycistronischer Expressionskassetten zu vergrößern, wurden adenovirale Gene aus dem Genom deletiert. Zusätzlich werden durch die Deletion viraler Gene, replikationsdefiziente und damit sichere Vektoren hergestellt, die nicht zur Bildung infektiöser Partikel in den Zielzellen führen.

Das in dieser Arbeit zur Herstellung replikationsdefizienter adenoviraler Vektoren verwendete Virus entspricht wegen seiner Deletionen der E1- und E3-Gene (Abb. 1.6) einem Vektortyp der ersten Generation. Mit der Deletion der E1-Region verliert das Virus die Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung der viralen Gene und zur Modulation des Zellzyklus²⁴⁶ bzw. der Fähigkeit zur Modulation der Immunantwort durch die Deletion der E3-Region. Diese Vektoren besitzen eine Klonierungskapazität von bis zu 8 kb und replizieren ausschließlich in Zellen, welche die deletierten Genprodukte *in trans* zur Verfügung stellen. Im allgemeinen erfolgte die Produktion adenoviraler Vektoren der ersten Generation in der speziell entwickelten Produktionszelllinie, die das linke ITR, die Verpackungssequenz, die E1A- und E1B-Region sowie einen Teil des IVa2-Gens des Adenovirusgenoms (siehe Abb. 1.6) stabil in ihrem Genom enthält²⁴⁷. Bei der Produktion von replikationsdefizienten Viren kann es durch homologe Rekombination zwischen den identischen Sequenzen des rekombinanten Virusgenoms und der adenoviralen Sequenzen in der Produktionszelllinie zur Bildung von infektiösen replikationskompetenten Adenoviren (*replication competent adenoviruses*, RCA) kommen. Durch die Entwicklung neuer Produktionszelllinien, die nur mit minimalen E1-Regionen stabil transfiziert wurden, konnte die Generierung von RCA durch homologe Rekombination weitgehend minimiert werden²³⁰.

Das relativ komplizierte Herstellungsverfahren adenoviraler Vektoren der ersten Generation hat die breitere Anwendung von rekombinanten Adenoviren behindert. Die meisten Verfahren zur Herstellung rekombinanter Adenoviren basieren auf der homologen Rekombination in der Produktionszelllinie²⁴⁸ bzw. in *E. coli*²⁴⁹. Diese Methoden liefern jedoch aufgrund der Größe des adenoviralen Genoms sowie der relativ niedrigen Rekombinationsfrequenz kein zufriedenstellendes Ergebnis^{246,249}. Auch das aufwendige Durchmustern der entstandenen Adenoviren, da besonders beim Rekombinationssystem eine große Zahl an nicht-rekombinanten Adenoviren produziert wird^{249,250}, ist ein Nachteil dieser Methoden.

Zur Herstellung der rekombinanten adenoviralen Vektoren wurde das in der Arbeitsgruppe Lindenmaier/Dittmar entwickelte, sehr einfache und effiziente adenovirale Cosmid-klonierungssystem verwendet (Abb. 1.7). Es basiert auf adenoviralen Cosmidvektoren, die

das gesamte Genom von Adenovirus Typ 5 mit Ausnahme der E1- und E3-Region enthalten. Durch konventionelle Klonierungsstrategien kann das gewünschte Transgen bzw. die Expressionskassette in die deletierte E1- oder E3-Region des adenoviralen Cosmidvektors inseriert und über die cos-Stelle des Lambda-Genoms *in vitro* in Lambda-Bacteriophagenpartikel verpackt werden. Durch die Positionierung der prokaryontischen Regulations- und Selektionssequenzen außerhalb der beiden ITRs des adenoviralen Genoms wird die Klonierungskapazität des Vektors nicht reduziert. Diese Kapazität zur Aufnahme von rekombinanter DNA ergibt sich aus der minimalen Größe infektiöser rekombinanter adenoviraler Vektoren, die bei circa 30 kb liegt, und der maximalen Größe adenoviraler DNA von 38 kb^{245,251}. Um die Klonierungskapazität von 8 kb optimal zu nutzen, können auch durch den Einsatz von IRES-Elementen (*internal ribosome entry site*) multicistronische Expressionskassetten inseriert werden. Durch IRES-Elemente können in eukaryontischen Zellen gleichzeitig mehrere codierende Sequenzen (Cistrons) von einem Promotor aus exprimiert werden^{252,253}.

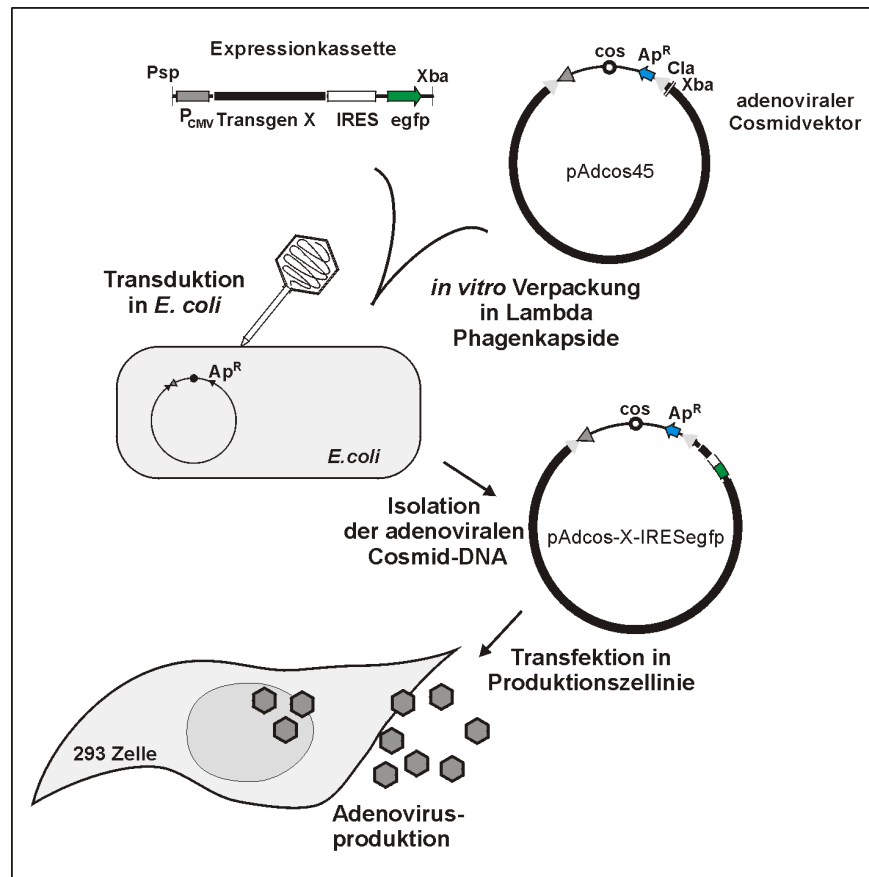


Abb. 1.7: Übersicht über das adenovirale Cosmidklonierungssystem zur Herstellung rekombinanter replikationsdefizienter Adenoviren. Erläuterungen siehe Text.

Die Transduktion von *E. coli* mit Hilfe der Phagenkapside erfolgt mit deutlich höherer Effizienz als die sonst übliche Transformation von Plasmid-DNA dieser Größe. Die Nutzung von Cosmiden zur Herstellung rekombinanter Adenoviren hat durch die selektive Verpackung der Cosmidvektoren noch einen weiteren Vorteil: Da nur Cosmidvektoren in einem Größenbereich zwischen 36 kb und 52 kb in das Phagenkapsid verpackt werden^{254,255} und adenovirale Cosmide ohne inserierte rekombinante DNA eine Größe von etwa 36 kb besitzen, werden bevorzugt Vektoren mit inserierter rekombinanter DNA

verpackt. Nach der Amplifikation der Cosmid-DNA in *E. coli* und Charakterisierung durch Restriktionsenzyme kann die Cosmid-DNA zur Produktion der Viren in die 293-Produktionszellen transfiziert werden, welche die deletierte E1-Region komplementieren und die virale DNA-Replikation ermöglichen. Ein weiterer Vorteil des adenoviralen Cosmid-klonierungssystems gegenüber den auf der homologen Rekombination basierenden Systemen ist, daß die zeitintensive und über mehrere Passagen dauernde Aufreinigung der rekombinanten Viren von nicht-rekombinanten Viren entfällt, da die Manipulation des adenoviralen Genoms bereits zuvor *in vitro* erfolgte.

1.5.4 Adenovirale Vektoren mit regulierbarer Transgen-Expression

Adenovirale Vektoren mit regulierbarer Expressionseinheit könnten für die Produktion der Viren sowie für die spätere Anwendung der rekombinanten Adenoviren aus mehreren Gründen von Vorteil sein. Neben einem effizienten Transfer in die Zielzellen ist oftmals auch eine regulierte und zeitlich limitierte Expression des therapeutischen Gens erwünscht. Wenn zytotoxisch wirkende Gene verwendet werden, könnte zudem die Möglichkeit zur Repression der Transgen-Expression während der Produktion der Viren in den Produktionszellen von Nutzen sein.

Basierend auf den Erfahrungen in der Arbeitsgruppe Lindenmaier/Dittmar bei der Generierung der adenoviralen Vektoren für die kostimulatorischen Moleküle RANK und RANKL wurden für die im Rahmen dieses Projektes geplante Herstellung replikationsdefizienter Adenoviren, die kostimulatorische Moleküle (1.4) codieren, regulierbare Expressionskassetten konstruiert. Die Entscheidung zur Entwicklung regulierbarer Expressionseinheiten wurde jedoch aus produktionstechnischen Gründen getroffen. Die Überexpression von RANK wirkte zytotoxisch auf die Produktionszellen und führte zu einem raschen Absterben der Zellen, so daß die primäre Adenovirusbildung inhibiert wurde.

Im Rahmen anderer Projekte wurde in der Arbeitsgruppe Lindenmaier/Dittmar bereits ein Tetracyclin-abhängiges Regulationssystem angewendet, das von der Firma Invitrogen als T-REX™-System angeboten wird (Abb. 1.8). Im Gegensatz zu anderen Regulationssystemen, wie dem *Tet-off*-²⁵⁶ oder dem *Tet-on*-System²⁵⁷, basiert das eingesetzte System ausschließlich auf dem Tetracyclin-Repressor (Tet-R). Der Tet-R wirkt nur bei exakter Positionierung der Tetracyclin-Operatorsequenzen (tetO) zur TATA-Box effektiv. In dem von Yao *et al.* erstmals beschriebenen System werden die tetO exakt 10 bp stromabwärts von dem letzten Nukleotid des TATA-Elementes innerhalb des humanen CMV-Promotors eingefügt²⁵⁸. In Abwesenheit von Tetracyclin bindet der Tet-R an die tetO und verhindert auf diese Weise vermutlich die Assoziation des TATA-Bindungsproteins (TBP) oder die Generierung des Prä-Initiationskomplexes für die Transkription. Dadurch wird die vom tetO-enthaltenen CMV-Promotor ausgehende Transkription unterbunden. Erst durch Zugabe von Tetracyclin wird die Transkription durch die Freisetzung des Repressors induziert. Die *in vitro* und *in vivo* Anwendbarkeit dieses Repressionssystems wurde in Experimenten mit Vero und Hela Zellen, die den Tet-R konstitutiv exprimierten, sowie nach Kotransfektion des Tet-R codierenden Plasmids mit einem CMV-tetO enthaltenden Reporterplasmid nachgewiesen²⁵⁸. Weitere Vorteile des Regulationssystems von Yao *et al.* im Vergleich zu anderen Tetracyclin-abhängigen Regulationssystemen sind die erheblich

höheren Induktionsraten^{257,258} und die Tatsache, daß der Tet-R gegenüber einigen der Tet-R-Fusionsproteine nicht toxisch auf die Zellen wirkt²⁵⁶.

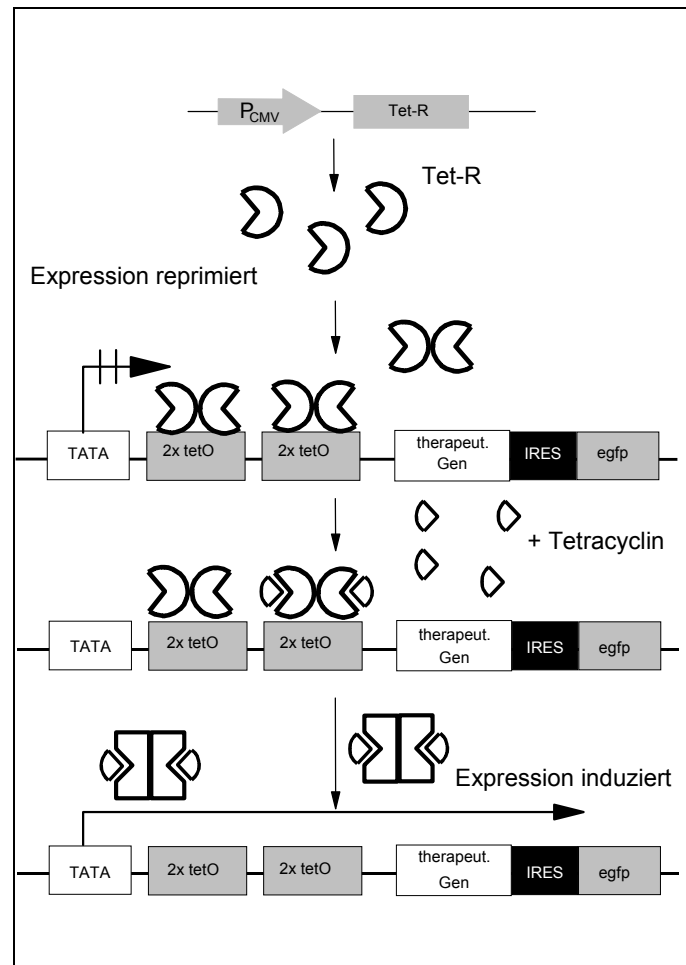


Abb. 1.8: Schematische Darstellung des Tetracyclin-regulierten Expressionssystems (TREX) für die Herstellung adenoviraler Vektoren mit regulierbarer Expressionskassette. Erläuterungen siehe Text.

Durch die Integration des tetO-enthaltenden CMV-Promotors aus dem T-R^{EX}TM-Regulationssystem (Invitrogen) in das adenovirale Cosmidklonierungssystem (Abb. 1.7) konnte dieses System sehr einfach zur Herstellung rekombinanter Adenoviren mit regulierbarer Transgen-Expression modifiziert werden.

1.6 Mausmodelle zur Untersuchung der Immunantwort gegen HPV-16

Die Assoziation von HPV-16 mit malignen Erkrankungen, die Identifikation des viralen Onkogens E7 als ein ideales tumorspezifisches Antigen und die Entdeckung der Kontrollfunktion des Immunsystems bei HPV-induzierten Tumore (siehe 1.1) waren fundamental für die Entwicklung E7-spezifischer Tumorstoffe. Die Untersuchung dieser Vakzine in Tiermodellen wird durch die fehlende Möglichkeit zur *in vitro* oder *in vivo* Produktion infektiöser Viren sowie der Artenspezifität der HPVs erschwert²⁵⁹. So wird die Effizienz von prophylaktischen und therapeutischen Vakzinen oft in Tieren mit bekannten Papillomavirus-assoziierten Krankheiten untersucht²⁵⁹. Obwohl keine natürlichen

Papillomaviren für die Labormaus bekannt sind und Mäuse nicht mit HPVs infiziert werden können, eignen sich Mausmodelle wegen der guten Kenntnisse über das murine Immunsystem zur Untersuchung der HPV-16-spezifischen Immunantwort. Die *in vitro* Transformation muriner Zellen mit dem gesamten Genom von HPV-16 bzw. der Onkogene E6 und E7 von HPV-16, die nach Injektion in Mäusen Tumore bilden, lieferten ein sehr einfaches Modell zur Analyse der Effizienz von HPV-16-spezifischen Vakzinen²⁶⁰. Durch die Immunisierung von Mäusen mit Peptidfragmenten von HPV-16 E7 konnte ein durch das murine MHC I-Molekül H-2D^b präsentierte CTL-Epitop in E7 identifiziert werden²⁶¹ (siehe Abb. 3.24), so daß die Aktivierung und Expansion der spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten untersucht werden kann. Da auch durch das humane MHC I-Molekül HLA-A*0201- (A2.1-) restringierte CTL-Epitope in E7 nachgewiesen wurden²⁶² (siehe Abb. 3.24), können in geeigneten Mausmodellen, wie der A2.1K^b-transgenen Maus²⁶³ auch die durch das humane A2.1-restringierten T-Zellantworten analysiert werden.

Die Immunisierung von Mäusen mit verschiedenen E7-spezifischen Vakzinen, wie rekombinanten Vakziniaviren²⁶⁴, rekombinanten Adenoviren²⁶⁵, Proteinen²⁶⁶ oder Peptiden²⁶¹ führte zur Induktion einer E7-spezifischen CTL-Antwort, die auch das Wachstum eines HPV-16 E7-transformierten Tumors verhinderte. Dieser therapeutische Effekt im Mausmodell konnte jedoch nicht in das Humansystem übertragen werden, da die Immunisierung von Tumorpatientinnen mit HPV-16 E7-spezifischen Peptiden nicht zur Initiation einer effektiven Immunantwort führte^{267,268}. Jedoch konnte durch *in vitro* Restimulation mit den Peptiden HPV-16 E7-spezifische CTLs aus den Tumorpatientinnen isoliert werden und die Existenz der E7-spezifischen T-Zellen gezeigt werden²⁶⁹⁻²⁷². Dies könnte bedeuten, daß die E7-spezifische Immunantwort in den Patientinnen offensichtlich nicht stark genug ist, um die Entwicklung des Tumors zu kontrollieren und die Existenz von spezifischen T-Zellen keine Aussage über die Entwicklung einer malignen Läsion erlaubt. Das Ziel einer erfolgreichen HPV-16-spezifischen Immuntherapie muß daher die Induktion einer effektiven primären T-Zellantwort bzw. die Verbesserung der existierenden Immunantwort sein. Aus diesem Grund eignen sich besonders dendritische Zellen (siehe 1.3) wegen ihres einzigartigen Potentials zur Aktivierung von T-Zellen für die Entwicklung einer HPV-16-spezifischen Immuntherapie mit therapeutischem Nutzen.

Wenn Mäuse mit E7-Protein-gepulsten dendritischen Zellen immunisiert wurden, konnte das Wachstum eines HPV-16 E7-transformierten Tumors durch die Induktion von E7-spezifischen CTLs kontrolliert werden²⁷³. Eine E7-spezifische T-Zellaktivierung konnte auch *in vitro* durch E7-gepulste dendritische Zellen aus gesunden Menschen¹⁷⁸ bzw. Tumorpatientinnen²⁷⁴ induziert werden. Über den therapeutischen *in vivo* Nutzen einer Immunisierung mit E7-gepulsten dendritischen Zellen im Rahmen einer klinischen Studie gibt es bislang keine Daten. Allerdings existieren einige Hinweise über die *in vivo* Effizienz von dendritischen Zellen aus einem E7-transgenen Mausmodell²⁷⁵. In diesem murinen Modell wird durch die E7-Expression in den Epithelzellen eine periphere Toleranz oder Anergie spezifisch gegen E7 in der T-Zellpopulation induziert^{276,277}. Im Gegensatz zu den nicht-transgenen Mäusen kann durch die Immunisierung mit E7-spezifischen Peptiden in der E7-transgenen Maus keine E7-spezifische T-Zellantwort induziert bzw. das Wachstum eines E7-transformierten Tumors kontrolliert und die periphere Toleranz gegen E7 durchbrochen werden^{276,277}. Dagegen konnte in den E7-transgenen

Mäusen durch die Immunisierung mit dendritischen Zellen, die mit E7-Peptid gepulst wurden, die Toleranz durchbrochen und eine CD8⁺-CTL-Antwort induziert werden²⁷⁵. Obwohl diese Ergebnisse die einzigartige immunstimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen demonstrieren, fehlen bislang die Ergebnisse der therapeutischen Wirkung gegen das Wachstum eines E7-transformierten Tumors aus diesem Mausmodell.

Obwohl die Immunkompetenz der Patientinnen mit einem HPV-16 positiven Tumor kontrolliert wurden, zeigen sie neben der schwachen natürlichen E7-spezifischen CTL-Antwort²⁷⁸ bzw. nach Immunisierung mit E7-Protein²⁷⁹ auch eine abgeschwächte CTL-Antwort gegen irrelevante Antigene²⁷⁸. Diese allgemeine Reduktion der CD8⁺-T-Zellantwort gegen irrelevante Antigene kann auch in der E7-transgenen Maus beobachtet werden²⁸⁰. Hierbei könnte es sich um einen E7-spezifischen Mechanismus handeln, der Kontrolle des Immunsystems zu entkommen. Ob es sich, wie bei anderen Tumoren beobachtet, um sezernierte immunsuppressiv wirkende Faktoren, wie TGF- β oder IL-10^{63,64} handelt, ist momentan unklar. Dieser E7-spezifische Effekt auf das Immunsystem demonstriert, daß die immunstimulatorische Eigenschaft von dendritischen Zellen optimal genutzt bzw. verbessert werden muß, um eine effektive Immuntherapie zu entwickeln. Ein Weg zur Verbesserung könnte die Verwendung von genetisch modifizierten statt gepulsten dendritischen Zellen sein, um möglichst viele antigene Determinanten eines tumorspezifischen Markers über einen längeren Zeitraum nutzen zu können (1.3.8). Aber auch die Nutzung von kostimulatorischen Signalen, wie denen der Mitglieder der TNF- bzw. TNFR-Superfamilie (1.4), könnte die stimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen verbessern.

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung des therapeutischen Nutzens einer Immuntherapie stellt die Immunisierung gegen mehrere spezifischen Antigene dar, wodurch die Möglichkeit des Tumors, der Immunkontrolle durch Verlust eines Antigens zu entkommen, reduziert wird. Für die HPV-16-spezifische Immuntherapie eignet sich die Integration des späten Proteins L1, der Hauptkomponente der HPV-16 Viruspartikel (1.1.1), als weiteres HPV-16-spezifisches Antigen. Die Expression von HPV-16 L1 in eukaryontischen Zellen führt zu der Bildung von leeren Viruskapsiden²⁸¹ (*virus-like particles*, VLP). In Mäusen konnte die Induktion einer HPV-16 L1-spezifischen Antikörperantwort nach Immunisierung mit den L1 VLP nachgewiesen werden²⁸², die gegen eine Infektion mit HPV-16 schützt^{283,284}. Neben der Antikörperantwort konnte aber auch eine L1-spezifische T-Zellantwort demonstriert werden^{285,286}. Die Kombination von E7 mit L1 würde neben der Integration eines weiteren Antigens für die T-Zell-vermittelte Immunantwort durch die Induktion einer L1-spezifischen Antikörperantwort auch zu einem Schutz gegen die Infektion mit HPV-16 führen. Durch die Fusion von L1 mit E7 konnten chimäre VLP (cVLP) generiert werden²⁸², die in Mäusen neben einer L1-spezifischen Antikörperantwort auch eine E7-spezifische T-Zellantwort, die das Wachstum eines E7-transformierten Tumors kontrolliert, induzieren²⁸⁷. Die Integration von L1 neben E7 in eine HPV-spezifische Immuntherapie könnte somit zu einer Sensibilisierung des Immunsystems gegen mehrere antigene Determinanten dienen und nach der Eliminierung des transformierten Gewebes vor einer erneuten Infektion mit HPV-16 schützen.

1.7 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Initiation einer Immunantwort gegen Antigen von HPV-16 durch Immunisierung mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen sowie der Einfluß von kostimulatorischen Molekülen der TNF- und TNFR-Superfamilie auf die immunstimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen untersucht werden.

Für die genetische Modifikation der dendritischen Zellen sollten replikationsdefiziente adenovirale Vektoren hergestellt werden, die entweder therapeutisch nutzbare Antigene von HPV-16 oder kostimulatorische Mitglieder der TNF- bzw. TNFR-Superfamilie codieren.

Die dendritischen Zellen sollten aus dem Knochenmark von Mäusen generiert und die Infektion mit den adenoviralen Vektoren sowie die Expression des Transgens charakterisiert werden. Danach sollte die Initiation einer HPV-16-spezifischen Immunantwort durch die Immunisierung mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen in einem transgenen Mausmodell untersucht werden, das die Analyse der murinen und humanen T-Zellantwort erlaubt. Anschließend sollte durch den zusätzlichen Transfer von kostimulatorischen Molekülen in dendritischen Zellen der Einfluß auf die stimulatorische Eigenschaft der Zellen betrachtet werden, indem die Initiation einer HPV-16-spezifischen Immunantwort als Maß für die immunstimulatorischen Eigenschaft der dendritischen Zellen dienen sollte.

2 Material und Methoden

Alle beschriebenen Methoden basieren, wenn nicht besonders gekennzeichnet, auf Standardmethoden^{288,289}.

2.1 Geräte

Begasungsbrutschrank	CO ₂ -Auto-Zero, Heraeus
Blotkammer	Miniblotter 014-300, Biometra
Cleanbench	HLB 2448, Heraeus
Digitale Bildaufnahme	Seescan Colour LC100C
Durchflußzytometer	Becton Dickinson FACS Calibur und Vantage mit Cell-Quest Software
Elektrophoresekammern	Horizon 58, Horizontal H3, BRL
ELISA-Reader	Murex MRX
Mikroskope	Axiovert S100, Zeiss
Geldokumentation	Cybertech-Geldokumentationssystem, Videocopyprocessor, Mitsubishi
Netzgeräte	Powerpack P25, Biometra
PCR-Gerät	PTC-200 von <i>MJ-RESEARCH</i>
Photometer	Spectronic Genesys 2, Milton Roy
Schüttler	IKA-Schüttler MTS4
SDS-PAGE-Apparatur	Biometra Minigel G41
Tischzentrifuge	Biofuge Pico, Heraeus
Kühlzentrifugen	Sorvall Superspeed GC5-C Minifuge T, Heraeus Sepatech
Ultrazentrifuge	DuPont Sorvall-Ultrazentrifuge TL100 mit Festwinkelrotor TLA 110

2.2 Materialien

Im Rahmen der Arbeit wurden Substanzen der Firmen Amersham, Aldrich, Applied Biosystems, Baker, Becton Dickinson, Biorad Boehringer, CSL, Fluka, Hoechst, Isotech, Merck, Millipore, Mimotopes, MoBiTec, New England Biolabs, Perkin Elmer, Promega, Qiagen, Riedel-de Haën, Roche, Seromed, Serva, Sigma und USB verwendet.

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt, welches mit einem Milli-Q-System (Millipore) aufbereitet wurde.

Alle Bakterienkulturmedien wurden autoklaviert (30 min, 121°C) und Zellkulturmedien sterilfiltriert (0,22 µm). Antibiotika und andere temperaturempfindliche Komponenten wurden ebenfalls sterilfiltriert und zum kühlen, sterilen Medium hinzugegeben.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Verwendete *E. coli*-Stämme

Folgende *Escherichia coli* Stämme wurden für die molekularbiologischen Arbeiten verwendet:

DH5α supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15 hsd R17 (r_k⁻m_k⁻) gyrA96 recA1endA1 relA1)

BHB2690 F⁻ recA λ^r (λD_{am}15 b2 red3 imm434 cIts Sam7)

BHB 2688 F⁻ recA λ^r (λE_{am}4 b2 red3 imm434 cIts Sam7)

2.3.2 Verwendete Plasmide

Für die Konstruktion der adenoviralen Vektoren mit HPV-Sequenzen, die auf dem HPV-16 Isolat 114/K²⁹⁰ beruhen, wurden Plasmide von L. Gissmann (DKFZ, Heidelberg, siehe auch Müller et al.²⁸²) bereitgestellt:

pCMV-E7mut: HPV-16 E7 (98 Aminosäuren) mit Mutationen in beiden Cys-X-X-Cys Elementen (58 Cys→Gly, 91 Cys→Gly), wie in Shi et al.²⁹¹ beschrieben

pCEPL1ΔC: HPV-16 L1 mit einer Deletion von 34 Aminosäuren am C-Terminus;

pCEP4L1/E7₁₋₆₀: HPV-16 L1ΔC an dem C-terminal die ersten 60 Aminosäuren von HPV-16 E7 fusioniert wurden;

pVL1392L1/E7mut: HPV-16 L1ΔC, das C-terminal mit dem gesamten HPV-16E7mut fusioniert wurde.

Für die Generierung adenoviraler Vektoren wurden auch HPV-16 L1 Sequenzen verwendet, deren *codon usage* für die Expression in der Pflanze *Solanum tuberosum* optimiert wurden (L1p). Die Proteinsequenz wurde durch die Optimierung der *codon usage* nicht verändert und entspricht weiter der des Isolates 114/K. Folgende Plasmide wurden von M. Müller (DKFZ, Heidelberg, siehe auch Leder et al.²⁹²) zur Verfügung gestellt:

pBS-II-HPV-16L1p: HPV-16 L1 mit optimierter *codon usage* für *Solanum tuberosum*;

pBS-II-HPV-16L1p/E7₁₋₆₀: HPV-L1p mit einer Deletion von 34 Aminosäuren am C-Terminus und Fusion der ersten 60 Aminosäuren von HPV-16 E7 an den C-Terminus.

Folgende Plasmide wurden für die Klonierungen in dieser Arbeit als Vektoren verwendet:

pGEMIRESegfp: von pGEM-T (Promega) abgeleitet, mit Expressionskassette bestehend aus CMV-Promotor, IRES (Poliovirus) und egfp (Clontech); W. Lindenmaier (GBF, Braunschweig);

- pGEMRec1IRESegfp: wie pGEMIRESegfp, jedoch mit bicistronischer Expressionskassette bestehend aus CMV-Promotor, Rec1, IRES (Poliovirus) und egfp (Clontech); W. Lindenmaier (GBF, Braunschweig);
- pAdcos45: Cosmid mit dem Genom von Adenovirus Typ 5 mit deletierter E1- und E3-Region; W. Lindenmaier (GBF, Braunschweig);
- pAdcos45Rec1IRESegfp: wie pAdcos45, jedoch mit bicistronischer Expressionskassette aus pGEMRec1IRESegfp in der deletierten E1-Region.

Von der Firma Invitrogen™ wurden die Plasmide pCR-BluntII-TOPO, pcDNA4TomyhisA und pcDNA6/Tet-R für die Klonierung der adenoviralen Vektoren, die kostimulatorische Moleküle codieren, verwendet.

2.3.3 DNA-Minipräparation

Die DNA-Minipräparationsmethode dient der Isolation kleiner Mengen an Plasmid-DNA aus Bakterien und erfolgt nach dem Protokoll von Birnboim und Doly²⁹³.

Kapsenbergröhrchen mit 2 ml LB-Flüssigmedium (10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Bacto-Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) und Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) als Selektionsantibiotikum wurden mit den entsprechenden Einzelkolonien angeimpft und mindestens 7 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Überführen der Bakteriensuspension in 2 ml Eppendorfhütchen wurden die Bakterien 5 min bei 12.000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl Suspensionspuffer (25 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA, 50 mM Glucose, 1 µg/ml RNase) resuspendiert. Daraufhin folgte die Zugabe von 200 µl Lysisbuffer (0,2 N NaOH, 1 % SDS). Durch Invertieren wird gemischt und 30 sec bei RT inkubiert. Zu den Lysaten wurden 200 µl Neutralisierungspuffer (3 M KAc pH 5,2) und 2 Tropfen Chloroform gegeben, durch Invertieren gemischt und anschließend das neutralisierte Lysat 5 min bei 12.000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1ml Eppendorfhütchen transferiert und erneut zentrifugiert (5 min, 12.000 rpm). Danach wurde der Überstand in ein neues 2ml Eppendorfhütchen überführt. Durch Zugabe von 1 ml vorgekühltem (-20°C) absolutem Ethanol wurde die Plasmid-DNA aus dem klaren Lysat für 15 min bei -70°C gefällt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 12.000 rpm in der Tischzentrifuge wurde das Pellet in 200 µl Puffer (0,1M NaAc pH 7, 0,05 M Tris pH 8) aufgenommen. 400 µl vorgekühltes absolutes Ethanol wird zugegeben und wieder für 15 min bei -70°C gefällt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand gründlich abgenommen und das Pellet getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 100µl Puffer (10 µg/ml RNase in H₂O) aufgenommen.

2.3.4 DNA-Maxipräparation

Für größere Mengen an Plasmid-DNA wurden aus einer Vorkultur 500 ml LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Bacto-Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml angeimpft und bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Die Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Nucleobond-Säulen AX 500 (Macherey-Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers. Die gefällte und aufgereinigte Plasmid-DNA wurde in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5 + 0,1 mM EDTA) aufgenommen.

2.3.5 DNA-Restriktionsspaltungen

Analytische Spaltungen für die Verifizierung der Konstrukte wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Dabei wurde nach folgendem Standardprotokoll verfahren, wobei sich je nach verwendetem Enzym oder verwendeter DNA Änderungen ergeben können:

20 µl Gesamtansatz: 0,5-2 µg DNA
5-10 U Restriktionsenzym
2 µl 10x Restriktionspuffer (evtl. BSA) nach Herstellerangaben
mit H₂O auf 20 µl Gesamtvolumen

Nach Zugabe des Restriktionsenzym wurde der Ansatz bei der jeweils optimalen Temperatur für 1 bis 1,5 h inkubiert. Anschließend wurde der Restriktionsansatz mit ¼ Volumen 5xTBE-Auftragungspuffer (5x TBE-Laufpuffer, 10 % Ficoll, 0,1 % SDS, 0,05 % Bromphenolblau) versetzt, im TBE-Agarosegel (2.3.7) aufgetrennt, und die ermittelten DNA-Fragmentgrößen mit den erwarteten Größen verglichen.

Für größere Mengen an DNA-Fragmenten, die für Klonierungen benötigt wurden, dienten präparative DNA-Spaltungen, die wie analytische Spaltungen durchgeführt wurden, allerdings in einem Gesamtvolumen von 100 µl.

100µl Gesamtansatz: 10-20 µg DNA
20-30 U Restriktionsenzym
10 µl 10x Restriktionspuffer (evtl. BSA) nach Herstellerangaben
mit H₂O auf 100 µl Gesamtvolumen

Die Spaltung wurde bei der für die verwendeten Enzyme optimalen Temperatur für 1 bis 1,5 h durchgeführt.

2.3.6 DNA-Ligation

Ein 25 µl Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,5 bis 3 µg je zu ligierende DNA-Fragmente
2,5 µl 10x Ligasepuffer (MBI)
15 U T4-Ligase (MBI)
mit H₂O auf 25 µl Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde für mindestens 2 h bzw. über Nacht bei RT ligiert. Anschließend wurde zur Überprüfung der Ligationseffizienz 10 µl Ligationsansatz mit ¼ Volumen 5x TBE-Auftragungspuffer versetzt und im TBE-Agarosegel (2.3.7) überprüft. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ligationsansatz direkt zur Transformation (2.3.13) oder zur *in vitro* Verpackung (2.3.14) eingesetzt.

2.3.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Für die Auftrennung von ungespaltenen und gespaltenen DNAs, aber auch von PCR-Fragmenten, dienen TBE-Agarosegele. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurde die Konzentration der Agarose zwischen 0,5 % und 2 % (w/v) variiert:

Agarose (%)	Größe der DNA-Fragmente (in kb)
0,5	1 -30
1,0	0,5 -10
1,5	0,2 -3
2,0	0,05-2

Nach Zugabe von $\frac{1}{4}$ Volumen 5x TBE-Auftragspuffer (5x TBE-Laufpuffer, 10 % Ficoll, 0,1 % SDS, 0,05 % Bromphenolblau) wurde die DNA-Probe auf das Agarosegel aufgetragen. Das Agarosegel wurde in 1x TBE-Puffer (45 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 45 mM Borsäure, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) angesetzt. Je nach der zu trennenden Fragmentgröße und der Agarosekonzentration wurde eine Spannung zwischen 40 V und 125 V angelegt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer verwendet. Nach gelelektrophoretischer Trennung der DNA-Fragmente wurde die DNA unter UV-Licht mittels der Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids auf dem Transilluminator nachgewiesen und photographisch dokumentiert.

Zur Abschätzung der Größe der DNA-Fragmente wurden folgende Längenstandards mit bekannten Fragmentgrößen benutzt:

- 100 bp Leader (weist Banden von 100 bp bis 2 kb im 100 bp Abstand auf)
- 500 bp Leader (weist Banden von 500 bp bis 5 kb im 500 bp Abstand auf)
- Lambda-DNA, geschnitten mit HindIII und/oder EcoRI

Die Fragmentgrößen der Lambda-Marker betragen:

λ/HindIII: 23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2027 bp, 564 bp, 125 bp

λ/EcoRI: 21226 bp, 7421 bp, 5804 bp, 5643 bp, 4878 bp, 3530 bp

λ/EcoRI-HindIII: 21226 bp, 5148 bp, 4973 bp, 4268 bp, 3530 bp, 2027 bp, 1904 bp, 1584 bp, 1375 bp, 947 bp, 831 bp, 564 bp, 125 bp

2.3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegele

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegele wurde das JETsorb System von Genomed® verwendet. Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht auf dem Transilluminator mit einem Skalpell herausgeschnitten und ausgewogen. Die Aufreinigung der DNA aus dem Agarosegel erfolgte nach Herstellerangaben, und die DNA wurde mit 40 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5 + 0,1 mM EDTA) eluiert. Abschließend wurde der DNA-Gehalt des Eluates über ein Agarosegel (2.3.7) kontrolliert.

2.3.9 Auffüllung von überhängenden DNA-Enden

Für die Herstellung von *blunt end* DNA-Fragmenten wurde die durch die T4 DNA-Polymerase (NEB) katalysierte Polymerisation durchgeführt, die 5'→3'-überhängende

einzelsträngige DNA-Enden als Matrizen verwendet. Die Reaktion wurde in einem 100 µl Ansatz durchgeführt, der sich wie folgt zusammensetzte:

5 bis 10 µg DNA
10 µl 10x T4-Polymerase Puffer (NEB)
30 U T4 DNA-Polymerase (NEB)
5 µl 2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
mit H₂O auf 100 µl Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde 15 min bei 37°C inkubiert, gefolgt von einer 5 minütigen Inaktivierung bei 70°C. Anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.3.12) durchgeführt und die mit Ethanol gefällte und getrocknete DNA in einem entsprechendem Volumen TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5 + 0,1 mM EDTA) bzw. in H₂O resuspendiert.

2.3.10 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Selbst-Ligation der Vektorfragmente während der Ligation zu verhindern, wurden einige der Vektoren durch Behandlung mit Kälberdarm-Phosphatase (CIP) an den 5'-Enden dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung erfolgte nach folgendem Protokoll:

200 µl CIP-Ansatz: Vektorfragment-DNA
20 µl 10x CIP-Puffer (Boehringer)
40 U CIP (Boehringer)
mit H₂O auf 200 µl Gesamtvolumen

Der CIP-Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und dann weitere 30 min bei 56°C inkubiert. Bei *blunt end* Vektoren wurden nach der Inkubation bei 56°C weitere 20 U CIP (Boehringer) zugegeben und die 30 minütigen Inkubationen bei 37°C und 56°C wiederholt. Anschließend wurde die CIP durch Zugabe von 5 µl 20 % SDS, 2 µl 0,5 M EDTA und 2 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 56°C für 30 min inaktiviert. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion (2.3.12) wurde die DNA mit Ethanol gefällt und die getrocknete DNA in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5 + 0,1 mM EDTA) oder H₂O resuspendiert. Abschließend wurde der DNA-Gehalt über ein Agarosegel (2.3.7) verifiziert.

2.3.11 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die OD bei 230, 260 und 280 nm gemessen. Für die Messung wurde eine 1:100 Verdünnung der vorliegenden DNA-Lösung hergestellt. Der Quotient aus der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorption ist ein Maß für die Reinheit der DNA und sollte zwischen 1,6 und 2 liegen. Die Werte bei 230 nm und 280 nm sollten ungefähr gleich sein. Die DNA-Konzentration wurde nach folgender Formel, basierend auf OD₂₆₀ = 1 entspricht 50 µg/ml dsDNA, berechnet:

$$(OD_{260} - OD_{280}) \times 2 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 = \text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}]$$

2.3.12 Phenol/Chloroform Extraktion und DNA-Fällung

Die von Proteinen zu reinigende DNA-Lösung wurde mit einem Volumen Phenol und einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und gründlich gemischt. Zur besseren Phasentrennung wurde das Gemisch 5 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von einem Volumen Chloroform zur Beseitigung von Phenolresten wurde erneut gemischt und anschließend 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Überführung der oberen Phase in ein neues Eppendorfgefäß wurde die DNA aus dieser wäßrigen Phase gefällt. Dazu wurden 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 7,0) und 2,5 Volumen absoluter vorgekühlter Ethanol zugegeben, gemischt und die DNA 30 min bei -70°C gefällt. Die gefällte DNA wurde 30 min bei 18.000 rpm, 4°C in einer Kühlzentrifuge (Sorvall) abzentrifugiert. Abschließend wurde das getrocknete DNA-Pellet in dem jeweils erforderlichen Puffervolumen aufgenommen.

2.3.13 Transformation

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach einem Protokoll von Hanahan^{294,295}. Für 5 bis 6 Transformationen wurden 50 ml SOB-Medium (2 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,01 mM MgCl₂, 0,01 mM MgSO₄) mit Kolonien von frisch ausgestrichenen *E. coli* DH5 α angeimpft. Bis zu einer OD₆₀₀ von 0,60 bis 0,65 wurde der Ansatz bei 37°C und 180 rpm geschüttelt und dann für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 10 min bei 2000 xg und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 16,6 ml TFB-Lösung (10 mM K-MES pH 6,2, 100 mM Rubidiumchlorid, 45 mM MnCl₂·4H₂O, 10 mM CaCl₂·2H₂O, 3 mM Hexaminocobalt(III)chlorid H₃CoCl₃, 1 M Morpholinoethansulfonsäure MES, pH 6,3) resuspendiert, gefolgt von einer 10 minütigen Inkubation auf Eis. Die Suspension wurde erneut bei 2000 xg und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml TFB-Lösung resuspendiert und mit 35 μ l DMSO versetzt. Nachdem der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert wurde, wurden 35 μ l DTT (2,25 mM DTT in 40 mM KAc pH 6) und nach weiteren 10 min auf Eis 35 μ l DMSO zugegeben. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis waren die Bakterien kompetent.

Die kompetenten Zellen wurden in 200 μ l Aliquots in 2 ml Reaktionsgefäße verteilt. Zwischen 5-10 μ l der zu transformierenden DNA wurde zu den kompetenten Zellen gegeben, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 90 sec in ein 42°C-Wasserbad gestellt. Nach Zugabe von 800 μ l SOC-Medium (SOB-Medium + 20 mM Glucose) wurde der Ansatz für 60 min bei 37°C geschüttelt. Nach Ausplattieren verschiedener Aliquots auf den entsprechenden Antibiotikaplatten wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Vergleich der Transformationseffizienz wurde das Plasmid pBR322 parallel transformiert.

Mit dieser Methode wurden mit dem Stamm DH5 α Transformationsraten von etwa 10⁷ Kolonien/ μ g pBR322-DNA erzielt.

2.3.14 Cosmid-Verpackung in Lambda-Bacteriophagenpartikel

Mit Hilfe der *in vitro* Verpackung in Lambda-Bacteriophagen und Transduktion in DH5 α können die großen Adenocosmide effizienter als durch Transformation in *E. coli* transferiert werden.

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden 10 ml NZ-Medium (10 g/l NZ-Amine, 5 g NaCl/l, 2 g/l MgCl₂·6H₂O) mit 0,4 % Maltose und 10 mM MgSO₄ versetzt, anschließend mit Kolonien von frisch ausgestrichenen DH5 α angeimpft und bis zu einer OD₅₅₀ von 2,5 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden für 10 min bei 7.500 xg, 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml eiskaltem 10 mM MgSO₄ resuspendiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Für die *in vitro* Verpackung in die λ -Bacteriophagenpartikel wurden in 1 ml Eppendorfgefäßen 10 μ l BHB2688 Verpackungslysatz, 5 μ l des Ligationsansatzes und 25 μ l BHB2690 Verpackungslysatz pipettiert und die Ansätze vorsichtig gemischt, ohne Luftblasen zu erzeugen. Als Kontrolle der Verpackungs- und Transduktionseffizienz wurden 100 ng pcos44²⁹⁶ verpackt und als Sterilkontrolle 2 μ l steriles H₂O. Die Verpackungsansätze wurden 90 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 μ l TM-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5 + 10 mM MgSO₄) und 20 μ l Chloroform zugegeben, gemischt und 4 min bei 10.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und zum Abdampfen des restlichen Chloroforms für 15 min bei 37°C inkubiert.

Für die Transduktion der verpackten Cosmide wurden 150 μ l TM-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5 + 10 mM MgSO₄) mit 150 μ l der kompetenten DH5 α und 150 μ l des Cosmid-Verpackungsansatzes gemischt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Für den Kontrollansatz sowie die Sterilkontrolle wurden 100 μ l TM-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5 + 10 mM MgSO₄) mit 100 μ l kompetenten DH5 α und 100 μ l des Verpackungsansatzes gemischt. 2 ml LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Bacto-Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) wurden in Kapsenbergröhrchen vorgelegt und die Transduktionsansätze zugegeben. Nach Inkubation für 1 h bei 37°C unter Schütteln wurden verschiedene Aliquots der Ansätze auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 μ g/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Es wurden Transduktionseffizienzen von ca. 10⁵ Kolonien/ μ g pcos44-DNA erzielt.

2.3.15 Maxipräparation von Adenocosmid-DNA

Die Aufreinigung der Cosmid-DNA über Nucleobond-Säulen AX500 (Macherey-Nagel) erfolgte weitestgehend nach dem Protokoll des Herstellers für die Cosmid-Aufreinigung unter Verwendung der doppelten Lösungsvolumina. Es wurden 500 ml LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Bacto-Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 μ g/ml aus einer Vorkultur angeimpft und für 18 h bei 180 rpm bei 37°C inkubiert. Abweichend zu dem Herstellerprotokoll wurde das Lysat nach Neutralisation im GSA-Rotor (Sorvall) für 10 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert und zusätzlich durch einen angefeuchteten Faltenfilter filtriert, um ein Zusetzen der Säulen zu vermeiden. Zudem wurde der Elutionspuffer abweichend zu den Herstellerangaben nicht auf 56°C, sondern 65°C vorgewärmt, das erste Eluat erneut auf 65°C erhitzt und ein zweites Mal über die gleiche Säule gegeben, um eine höhere Ausbeute zu erzielen. Nach

Isopropanolfällung der eluierten DNA erfolgte die Zentrifugation der ausgefällten Cosmid-DNA in 30 ml Sorvallglaszentrifugengefäßen im Ausschwenkrotor HB-4 (Sorvall) bei 10.000 rpm, 4°C für 30 min. Durch diese Modifikationen des Herstellerprotokolls konnte die Ausbeute aus 500 ml Kultur auf 200 bis 600 µg DNA erhöht werden.

2.3.16 Isolierung der RNA aus murinen Lymphozyten

Für die Isolierung der RNA aus murinen Lymphozyten wurde das Qiagen® RNeasy Mini System mit Qiagen® RNase-freier DNase verwendet.

Für die Isolierung aktivierter Lymphozyten wurde eine weibliche C57Bl/6 Maus subkutan an der Schwanzbasis mit 100 µl kompletten Freund'schem Adjuvant (1:2 verdünnt mit PBS, Sigma) immunisiert. Vier Tage später wurde die Milz isoliert und mit Hilfe eines Zellsiebes (70 µm Porendurchmesser, Becton Dickinson) eine Einzelzellsuspension der Milzzellen hergestellt. Die Zellsuspension wurde in ein neues 15 ml Röhrchen (Greiner) überführt und 10 min bei 230 xg, RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem 1ml MEM (Gibco BRL) mit 1 % Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin resuspendiert. Zur Aufreinigung der Lymphozyten aus der Zellsuspension wurden die Zellen mit Hilfe einer Pasteurpipette mit 3 ml Ficoll Paque™ (Amersham) unterlegt. Die Ficoll/Zellsuspension wurde für 30 min bei 575 xg, 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Lymphozyten, die sich in der Interphase befanden, vorsichtig abgezogen und in ein neues 15 ml Röhrchen überführt. Um restliches Ficoll zu entfernen, wurden die Lymphozyten dreimal mit 10 ml PBS (150 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 3 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄) gewaschen. Nach dem dritten Waschschrift erfolgte die Isolierung und Aufreinigung der RNA aus den Lymphozyten nach Herstellerangaben.

2.3.17 Erststrang cDNA-Synthese

Die Erststrang cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe der SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transkriptase (Invitrogen™) und Oligo(dT)₁₈-Primern. Als Matrize wurde die unter 2.3.16 isolierte RNA verwendet. Die cDNA-Synthese wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, allerdings wurde statt eines 20 µl Ansatzes ein 50 µl Ansatz mit 8 µl RNA verwendet.

2.3.18 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle Oligonukleotid-Primer (Gibco BRL) in Tab. 2.1 wurden mit Hilfe von *VectorNTI* (InforMax, Inc.) wenn möglich so konstruiert, daß sie mindestens mit ca. 20 Nukleotiden an der Template-DNA hybridisieren, einen GC-Gehalt von etwa 50 % aufweisen, an dem 3'-Ende mit zwei Gs oder Cs abschließen, die Primerpaare keine Sekundärstrukturen ausbilden und sich in ihrer theoretischen Schmelztemperatur nur um wenige °C unterscheiden. Für die Konstruktion des adenoviralen Cosmidvektors mit dem HPV-16 L1pΔC-Gen, das ein C-terminal um 34 Aminosäuren deletiertes HPV-16 L1 mit einer für die Expression in Pflanzen optimierten *codon usage* enthält, wurde der entsprechende HPV-16 L1p-Bereich mittels PCR aus dem Plasmid pBS-II-L1p amplifiziert. Für die Klonierung des HPV-16 E7mut in die bicistronische Expressionskassette wurde das Gen aus dem

Plasmid pCMV-E7mut amplifiziert. Die Oligonukleotid-Primer für diese PCR-Reaktion wurden von T. Jacobs (GBF, Braunschweig) bereitgestellt.

Tab. 2.1: Oligonukleotid-Primerpaare für die Amplifikation von HPV-16 L1pΔC, E7mut sowie die Gene der kostimulatorischen Moleküle. Die Restriktionsschnittstellen für NheI in den 5'- bzw. XhoI in den 3'-Primern für die Amplifikation der kostimulatorischen Moleküle sowie für NotI in den E7mut-spezifischen Oligonukleotid-Primer wurden markierten.

PCR-Produkt	5'-Primer	3'-Primer	Schmelztemp.	Größe [bp]
HPV-16 L1pΔC	5' ATATGTCACCTTTGGCTTCCAT CAGAAGC ^{3'}	5' TTTTCCCGGGGCTTAGATATC TTGTAGTAAAAATTGCGTCC ^{3'}	54,4°C	1436
HPV-16 E7mut	5' ATAAGAGCGGCCGCGCCACC ATGCATGGAGATACACCTAC ^{3'}	5' ATAAGAGCGGCCGCTTATGG TTTCTGAGAACAGATGG ^{3'}	57°C	320
murine CD40	5' AAAGCTAGCGCCCTGCATGG TGTCTTTGCCTCGG ^{3'}	5' AAAA <u>CTCGAG</u> AGGTCAGCAA GCAGCCATCGCCTCC ^{3'}	64,1°C	937
murine CD40L	5' AAAGCTAGCGCATGATAGAA ACATACAGCCAACCTTCCC ^{3'}	5' AAAA <u>CTCGAG</u> GCACTGTTCA GAGTTTGAGTAAGCCAAAAG ^{3'}	57,1°C	811
murine 4-1BB	5' AAAGCTAGCGGAAAGGAGCC TGTCACAGAAAACC ^{3'}	5' AAAA <u>CTCGAG</u> ATGGTGGGGT CCTAGTGCTTCTCGG ^{3'}	61,9°C	900
murine 4-1BBL	5' AAAGCTAGCACTGACCGACC GTGGTAATGGAC ^{3'}	5' AAAA <u>CTCGAG</u> GGAGTCACAA GAAGGATAGTTCTCATTCCC ^{3'}	61°C	988

Für die Amplifikation der Gene der kostimulatorischen Moleküle wurden anhand der GenBank-Sequenzeinträge (CD40: M83312, CD40L: X65453, 4-1BB: J04492, 4-1BBL: L15435) spezifische Oligonukleotid-Primerpaare entwickelt.

Die Primer für die Amplifikation von HPV-16 L1pΔC und E7mut wurden vor der PCR mit Hilfe der T4 Polynukleotid-Kinase (New England Biolabs) nach Herstellerangaben phosphoryliert.

Für alle PCR-Ansätze wurde die PLATINUM[®] Pfx-DNA-Polymerase (Invitrogen[™]) in einem 50 µl Ansatz verwendet, der sich wie folgt zusammensetzte:

- 1 µl Template-DNA (1/100 Verdünnung der Plasmid-DNA)
- 5 µl 10x Pfx Amplifikationspuffer
- 1 µl 50 mM MgSO₄
- 1,5 µl 10 mM dNTPs
- 1 µl Primer-Mix (je 20 pMol/µl)
- 0,5 µl PLATINUM[®] Pfx-DNA-Polymerase (2,5 U/µl)
- 40 µl H₂O.

Verwendetes PCR-Programm, wobei X die jeweilige Schmelztemperatur (Tab. 2.1) darstellt :

- 1 Zyklus 94°C, 5 min
- 25 Zyklen 94°C, 1 min; X °C, 1 min; 68°C, 1,5 min
- 1 Zyklus 68°C, 10 min

Bei der Amplifikation der kostimulatorischen Moleküle wurden statt der 25 Zyklen im Standardprogramm 35 Zyklen verwendet.

2.3.19 Zero Blunt® TOPO® PCR Klonierungssystem

Um bei Bedarf auch sehr geringe Mengen an PCR-Produkten zu sichern und in *E. coli* amplifizieren zu können, wurde das Zero Blunt® TOPO® PCR Klonierungssystem von Invitrogen™ verwendet. Durch die Verwendung dieses Klonierungssystems konnten die inserierten PCR-Fragmente anschließend mit allgemeinen Sequenzierungsprimern sequenziert werden. Die Klonierung der amplifizierten Gene für kostimulatorische Moleküle in pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen™) erfolgte nach Herstellerangaben.

2.3.20 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzen der durch PCR amplifizierten Gene wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Für die Sequenzierung wurde der Applied Biosystem ABI PRISM® Kapillarsequenzer (Perkin Elmer Applied Biosystems) verwendet. Die Sequenzierung erfolgte nach der ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Thermocycle Methode. Die zu sequenzierende Plasmid-DNA wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep System (QIAGEN) nach Herstellerangaben isoliert und aufgereinigt. Die Sequenzierungsreaktion sowie die anschließende Aufarbeitung der Sequenzierungsproben wurden nach dem Protokoll von Applied Biosystems durchgeführt, wobei sich der Sequenzierungsansatz wie folgt zusammensetzte:

200-500 ng Plasmid-DNA

4 µl ABI PRISM® Big Dye™ mit Ampli Tag FS Sequenzierungslösung

1 µl Sequenzierungsprimer (3,2 pMol/µl, Tab. 2.2)

mit H₂O auf 20 µl Gesamtvolumen

Die Sequenzierungsprimer für HPV-16 L1pΔC und E7mut wurden mit *VectorNTI* (InforMax, Inc.) konstruiert. Für die Gene der kostimulatorischen Moleküle wurden die im Zero Blunt® TOPO® PCR Klonierungssystem (Invitrogen™) enthaltenden Sequenzierungsprimer (M13 *forward* und M13 *reverse*) verwendet.

Tab. 2.2: Primer für die Sequenzierung von HPV-16 L1pΔC, HPV-16 E7mut sowie die Gene der kostimulatorischen Moleküle.

PCR-Produkt	5'-Sequenzierungsprimer	3'-Sequenzierungsprimer
HPV-16 L1pΔC	L1ΔCp1: 5'GGGACCGATCCAGCC3'	L1ΔCp1': 5'TCTGGGGTGGGTACA3'
	L1ΔCp2: 5'GATTGTCCACCATTAGAGT3'	L1ΔCp2': 5'GTATAAATCGTCTGG3'
	L1ΔCp3: 5'CGTTATGACATACATAC3'	L1ΔCp3': 5'GTCAGGAAAACCAAACCTT3'
HPV-16 E7mut	5'TCCAAAATGTCGTAACAACTCCGC3'	5'TCTGGGGTGGGTACA3'
kostim. Moleküle	M13 rev: 5'CAGGAAACAGCTATGAC3'	M13 forward: 5'GTAAAACGACGGCCAG3'

Für die DNA-Sequenzierungsreaktion wurde folgendes PCR-Programm benutzt:

25 Zyklen 96°C, 30 sec; 50°C, 15 sec; 60°C, 4 min

2.4 Methoden für die Kultur eukaryontischer Zellen

Alle Arbeiten mit den unten genannten Zelllinien und primären Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank (Cleanbench) durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und Medien wurden nach Zugabe der jeweiligen Zusätze vor ihrer ersten Verwendung mit einer Filtrationseinheit (0,2 µm; Nalgene) sterilfiltriert. Für die Kultivierung der Zellen wurden sterile Zellkulturflaschen (Nuncleon) verwendet. Alle Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt im Zellkulturbrutschrank (Heraeus) kultiviert.

2.4.1 Zelllinien

- 293LP: humane embryonale Nieren-Zelllinie, Microbix Biosystems Inc.[®]
A549: Zelllinie aus einem humanen Lungenkarzinom, ATCC CCL-185
EL4.E7: E7-exprimierende murine Thymoma-Zelllinie(H-2^b)²⁹⁷
EL4.A2.1: murine Thymoma-Zelllinie (H-2^b), die A2.1K^b exprimiert²⁷⁶

2.4.2 Kulturmedien und Lösungen

Alle Reagenzien wurden in deionisiertem Wasser einer Milli-Q-Filtrationsanlage (Millipore) gelöst und sterilfiltriert (Porengröße 2 µm).

- 1x DME: 1 Packung DME (Gibco BRL) mit 2 mM Glutamax
37,5 g NaHCO₃
100 ml HEPES
auf 10 Liter
pH 7,0
- 1x MEM: 1 Packung MEM (Gibco BRL) mit 2 mM Glutamax
4,25 g NaHCO₃
50 ml HEPES
auf 5 Liter
pH 7,0
- 1x RPMI1640 1 Packung RPMI (Gibco BRL) mit 2 mM Glutamax
20 g NaHCO₃
100 ml HEPES
auf 10 Liter
pH 7,0
- FCS: Das fötale Kälberserum (Bio-Whittaker bzw. CSL) wurde vor Gebrauch für 1 h bei 56°C inkubiert und in Aliquots bei -20°C gelagert.
- 100x Glutamin: 29,23 g/l L-Glutamin (200 mM); diese Stammlösung wurde in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

100x Pen/Strep:	6,06 g/l Ampicillin (10000 U/ml) + 10 g/l Streptomycin Zum Lösen mit NaOH auf pH 7,0 einstellen und in Aliquots bei -20°C lagern.
100x β -ME	35 μ l β -ME (14,3 M, Merck) pro 10 Liter RPMI1640 gebrauchsfertige Aliquots wurden bei -20°C gelagert
1x PBS:	150 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM KCl 1,47 mM KH ₂ PO ₄
PBS ⁺⁺ :	
Lösung A:	80 g NaCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ 2 g KCl 2 g KH ₂ PO ₄ auf 1 Liter
Lösung B:	1 g CaCl ₂ ·2 H ₂ O auf 100 ml
Lösung C:	1 g MgCl ₂ auf 100 ml
PBS ⁺⁺ setzt sich zusammen aus:	88 ml H ₂ O 10 ml Lösung A 1 ml Lösung B 1 ml Lösung C
TEP:	0,075 % Trypsin (Gibco BRL) 6,25 mM EDTA in PBS
2xHEBS:	300 mM NaCl 40 mM HEPES 10 mM KCl 14 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,5
2.5 M CaCl ₂ :	367,55 g/l CaCl ₂ ·H ₂ O

2.4.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit einer Lebendfärbung mit einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung (Sigma) in einer Zählkammer (Neubauer) bestimmt. Die Auszählung erfolgte in zwei bis vier Großquadraten mit je 16 Quadraten (Tiefe 0,1 mm, Seitenlänge 0,25 mm). Die Zelldichte wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{gezählte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4}{\text{Anzahl ausgezählter Großquadrate}} = \text{Zellen/ml}$$

2.4.4 Passagieren von Zellen

Bei Erreichen der Konfluenz wurden die adhärenenten 293LP und A549 Zellen in Verdünnungen zwischen 1:4 und 1:10 umgesetzt. Zum Passagieren wurde das Medium abgezogen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend TEP zugegeben. Nach einigen Minuten lösten sich die Zellen sichtbar von der Zellkulturoberfläche ab, was durch Abschlagen unterstützt wurde. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde Medium mit FCS zugegeben und die Zellen durch Pipettieren suspendiert. Die Zellsuspension wurde in frischem Medium verdünnt und in neue Zellkulturflaschen überführt.

2.4.5 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Für die Konservierung sollten sich die Zellen gerade am Ende der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Adhärenente Zellen wurden nach 2.4.4 abtrypsinisiert. Die abgelösten Zellen bzw. Suspensionszellen wurden 5 min bei 150 xg, 4°C zentrifugiert, einmal mit Medium gewaschen und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in vorgekühltem (4°C) Einfriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) aufgenommen und das Volumen so eingestellt, daß die Endkonzentration 2×10^6 Zellen/ml betrug. In 1 ml Aliquots wurde die Zellsuspension auf Kryoröhrchen verteilt und die Zellen über Nacht bei -70°C gelagert. Nach der Lagerung bei -70°C wurden die Zellen in einem Aufbewahrungsbehälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in einem 37°C-Wasserbad unter kontinuierlichem Schwenken aufgetaut. Die Zellsuspension wurde mit 5 ml vorgewärmten Medium verdünnt und 5 min bei 150 xg, 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit Medium gewaschen und anschließend wurden $1,5 \times 10^7$ Zellen in eine mittlere Kulturflasche (75 cm², Nunc) überführt und bei 37°C kultiviert.

2.4.6 Transfektion (Calciumphosphat-Kopräzipitation)

Die Herstellung der adenoviraler Vektoren mit der nicht regulierbaren Expressionskassette erfolgte durch Transfektion von 293LP Zellen mit der Cosmid-DNA.

Zwei Tage vor der Transfektion wurden 293LP Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen (Nunc) ausgesät, so daß die Zellen am Tag der Transfektion zu 80-90 % Konfluenz erreicht hatten. Vier Stunden vor der Transfektion wurde ein Medienwechsel in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL) mit 10 % FCS (Bio-Whittaker), 1 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin durchgeführt. Die Transfektion erfolgte durch Calciumphosphat-DNA-Kopräzipitation. Das eingesetzte Präzipitatvolumen betrug 1/10 des Gesamtkulturvolumens und wurde in zwei Polystyrolröhrchen angesetzt. Bei der Transfektion von Zellen in einer 75 cm² Zellkulturflasche wurden in das erste Polystyrolröhrchen 1,25 ml 2x HEBES-Puffer (300 mM NaCl, 40 mM HEPES, 10 mM KCl, 14 mM Na₂HPO₄ pH 7,4) vorgelegt. In das zweite Polystyrolröhrchen wurden 20 µg DNA, 125 µl 2,5 M CaCl₂ (Endkonzentration 0,125 M) und 1105 µl Wasser vorgelegt. Unter Vortexen wurde der Inhalt des zweiten Röhrchens tröpfchenweise in den HEBES-Puffer pipettiert und das Präzipitat für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat mit der Glaspipette resuspendiert und auf die Zellen gegeben. Die transfizierten Zellen wurden

über Nacht im Zellkulturschrank inkubiert und am nächsten Tag ein Medienwechsel zu MEM mit 5% FCS, 1 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin durchgeführt. Die Transfektionseffizienz von EGFP-exprimierenden Konstrukten wurde am Tag 3 nach der Transfektion am Fluoreszenzmikroskop (2.5.6) abgeschätzt.

2.4.7 Kotransfektion

Zur Herstellung replikationsdefizienter Vektoren mit regulierbarer Transgen-Expression wurde das für den Tetracyclin-Repressor codierende Plasmid pcDNA6/TR (InvitrogenTM) simultan mit den jeweiligen adenoviralen Cosmiden in 293LP Zellen transfiziert.

Für die Kotransfektion in 293LP Zellen, wie unter 2.4.6 beschrieben, wurde ein molares Verhältnis von Cosmid-DNA zu pcDNA6/TR von 1:6 gewählt, um sicherzustellen, daß alle mit dem adenoviralen Cosmidvektor transfizierten Zellen gleichzeitig mit mindestens einem Repressorplasmid transfiziert wurden. Die Transfektions- oder Repressionseffizienz des Systems von EGFP-exprimierenden Konstrukten wurde fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert.

2.4.8 Isolierung und Kultivierung muriner dendritischer Zellen

Die Isolierung der dendritischen Zellen erfolgte aus dem Knochenmark von Mäusen. Dafür wurden Femur und Tibia isoliert und das Knochenmark mit Serum-freien RPMI 1640-Medium (Gibco BRL) mit 1 % Glutamin, 50 µM β-ME und 1 % Penicillin/Streptomycin ausgespült. Mit Hilfe eines Zellsiebes (70 µm Porendurchmesser, Becton Dickinson) wurde eine Einzelzellsuspension der Knochenmarkszellen hergestellt. Die Zellsuspension wurde dann in ein neues 50ml Röhrchen (Greiner) überführt und für 10 min bei 230 xg, RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Erythrozyten-Lysispuffer pH 7,2 (17 mM Tris/HCl pH 7,6, 150 mM NH₄Cl) mit 10 % FCS (Bio-Whittaker bzw. CSL) resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 230 xg, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml RPMI 1640-Medium (Gibco BRL) mit 10 % FCS (Bio-Whittaker bzw. CSL), 1 % Glutamin, 50 µM β-ME und 1 % Penicillin/Streptomycin resuspendiert. Die Lebendzellzahl wurde mittels einer Trypanblau-Färbung bestimmt und die Zelldichte auf 1,5-2x10⁶/ml mit Medium eingestellt. Nach Zugabe von 0,5 ng/ml murinem GM-CSF (Peprotech, Inc.) und 1 ng/ml murinem IL-4 (Peprotech, Inc.) wurden die Zellen im Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ kultiviert. Alle zwei Tage wurden 75-80 % des RPMI-Mediums vorsichtig abgezogen, in ein neues 50 ml Röhrchen (Greiner) überführt und für 10 min bei 230 xg, RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im entsprechendem Volumen RPMI 1640-Medium (Gibco BRL) mit 10 % FCS (Bio-Whittaker bzw. CSL), 1 % Glutamin, 50 µM β-ME, 1 % Penicillin/Streptomycin, 0,5 ng/ml murinem GM-CSF und 1 ng/ml murinem IL-4 resuspendiert, zurück zur restlichen Kultur gegeben und die Zellen weiterkultiviert.

Am Tag 4 der Kultur erfolgte die Infektion der Zellen mit den replikationsdefizienten Adenoviren (2.4.9).

Zwischen Tag 6 und Tag 10 der Kultivierung zeigten 40-70 % der Zellen die typische Morphologie von dendritischen Zellen. Für die Analyse der dendritischen Zellen im FACS

(2.6.5), die Expressionsanalysen (2.6.4) sowie die Immunisierung der Mäuse (2.7.1) wurden die nicht adhärenenten und leicht adhärenenten Zellen verwendet.

2.4.9 Infektion muriner dendritischer Zellen

Am Tag 4 nach der Isolation der Knochenmarkszellen zur Generierung dendritischer Zellen (2.4.8) erfolgte die Infektion mit den replikationsdefizienten Adenoviren. Für die Infektion wurden von den jeweiligen CsCl-gereinigten bzw. dialysierten Adenovirusstocks Verdünnungen mit der gewünschten *multiplicity of infection* (MOI) in PBS mit 2 % FCS (Bio-Whittaker bzw. CSL) in einem Gesamtvolumen von 1/10 des Kulturvolumens eingesetzt. Dafür wurde das gesamte RPMI-Medium abgezogen, in ein neues 50 ml Röhrchen (Greiner) überführt und für 10 min bei 230 xg, RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in der jeweiligen Virusverdünnung oder in PBS/2 % FCS (Mock) aufgenommen, zurück zur Kulturflasche gegeben und für 1 h auf dem Rocker inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von RPMI 1640-Medium (Gibco BRL) mit 10 % FCS (Bio-Whittaker bzw. CSL), 1 % Glutamin, 50 µM β-ME, 1 % Penicillin/Streptomycin, 0,5 ng/ml murinem GM-CSF und 1 ng/ml murinem IL-4 die Kultur auf das jeweilige Ausgangsvolumen aufgefüllt und die Zellen bei 37°C, 5 % CO₂ im Inkubator weiterkultiviert.

Für den Expressionsnachweis der HPV-16 Proteine und der kostimulatorischen Moleküle nach der Infektion mit den entsprechenden adenoviralen Vektoren wurde das Zellpellet der dendritischen Zellen am Tag 4 nach der Isolation in 1-2 ml PBS/2 % FCS resuspendiert und Aliquots in jeweils eine Kammer der 8er Kammerdeckgläschen (LabTek, Nuncleon) transferiert. Die Infektion mit den adenoviralen Vektoren erfolgte wie oben beschrieben.

2.4.10 Infektion humaner dendritischer Zellen

Humane dendritische Zellen wurden aus 60ml peripherem Blut über Ficoll-Gradienten isoliert (K. Dittmar, GBF). Am Tag 4 nach der Isolation wurde ein Teil der Zellen aus großen Zellkulturflaschen (175 cm², Nuncleon) in 4er Kammerdeckgläschen (LabTek, Nuncleon) umgesetzt. Das Medium wurde dazu abgezogen und die Zellen für 10 min bei 230 xg abzentrifugiert. Die in den Zellkulturflaschen verbliebenen adhärenenten Zellen wurden zweimal mit je 20 ml PBS mit 5mM EDTA gewaschen und für 30 min auf Eis inkubiert. Alle Lösungen wurden mit dem zuvor abzentrifugierten Zellpellet vereinigt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 230 xg wurde das Gesamtzellpellet zweimal mit jeweils 10 ml RPMI-1640 gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in 20 ml RPMI-1640/10 % FCS mit IL-4 (1:1000) und GM-CSF (1:1000) aufgenommen. 1/40 der resuspendierten Zellen wurden nach Zentrifugation bei 230 xg, 10 min, 4°C in jeweils 200 µl der Virusverdünnung (1:1000 Verdünnungen der CsCl-gereinigten Adenovirusstocks) oder in 200 µl PBS/2 % FCS (Mock-Infektion) resuspendiert und in jeweils eine Kammer des 4er Kammerdeckgläschen (LabTek, Nuncleon) transferiert. Die Zellen wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rocker inkubiert. Anschließend wurden 800 µl RPMI-Medium mit 10 % FCS, GM-CSF (1:1000) und IL-4 (1:1000) zugegeben und die Zellen bei 37°C, 5 %CO₂ kultiviert. Für immunozytochemische Färbungen wurden die Zellen zwei Tage nach der Infektion mit Formaldehyd (3 % Endkonzentration) fixiert und mit PBS gewaschen, wie unter 2.6.4 beschrieben.

2.5 Methoden zur Herstellung replikationsdefizienter Adenoviren

Nach Transfektion der 293LP mit der adenoviralen Cosmid-DNA wurden die Transfektionsansätze regelmäßig fluoreszenzmikroskopisch auf Plaquebildung untersucht. Alle 5-6 Tage wurde ein Medienwechsel in MEM mit 5 % FCS, 1 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin durchgeführt. Die ersten adenoviralen Plaques wurden zumeist zwischen Tag 10 und Tag 14 identifiziert.

2.5.1 Replikationsdefiziente rekombinante Adenoviren

Folgende rekombinante Adenoviren mit mono- bzw. bicistronischer Expressionskassette in der deletierten E1-Region für diese Arbeit von W. Lindenmaier (GBF, Braunschweig) bereitgestellt:

Adegfp:	Vektor mit dem egfp-Reportergen (Clontech) unter direkter Kontrolle des CMV-Promotors;
AdRANK:	Vektor mit bicistronischer Expressionskassette bestehend aus CMV-Promotor, dem Gen für das murine RANK, IRES (Poliovirus) und egfp (Clontech);
AdRANKL:	Vektor mit bicistronischer Expressionskassette bestehend aus CMV-Promotor, dem Gen für das murine RANKL, IRES (Poliovirus) und egfp (Clontech).

2.5.2 Herstellung primärer Adenovirusstocks

Nach Identifikation der ersten adenoviralen Plaques wurden die transfizierten Zellen weiterkultiviert bis die meisten Zellen durch die EGFP-Expression nachweisbar infiziert waren und begannen, sich durch die zytopathischen Effekte der Adenovirusproduktion von der Zellkulturoberfläche abzulösen. Die Zellen wurden durch Schaben mit einem Zellschaber (Nuncleon) geerntet und die Virus/Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen (Greiner) überführt. Die Zellen wurden 10 min bei 230 xg, 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und bei -70°C aufbewahrt. Das Zellpellet wurde in 2,5 bis 5 ml PBS⁺⁺ pro 75 cm² Zellkulturflasche (Nuncleon) resuspendiert. Für den Zellaufschluß wurden drei aufeinanderfolgende *freeze-thaw*-Zyklen durchgeführt, indem die Suspension bei -70°C eingefroren und anschließend im 37°C Wasserbad aufgetaut wurde. Die Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation bei 345 xg, 10 min, 4°C abzentrifugiert und das Lysat (Überstand) in ein neues 15 ml Röhrchen (Greiner) überführt. Die Lagerung dieses als primärer Adenovirusstock bezeichneten *freeze-thaw-lysates* erfolgte bei -70°C.

2.5.3 Herstellung sekundärer Adenovirusstocks

Sekundäre Adenovirusstocks der verschiedenen adenoviralen Vektoren wurden angelegt, um größere Mengen des rekombinanten Virus zu erhalten. Dazu wurde eine große Zellkulturflasche (175 cm², Nuncleon) mit 293LP Zellen ausgesät und die Zellen im Inkubator bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Für die Infektion wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit einer 1:5 bis 1:10 Verdünnung des primären Adenovirusstocks in PBS mit 2 % FCS in einem Gesamtvolumen von 5 ml für 1 h auf dem Rocker bei

RT inkubiert. Nach der Zugabe von 45 ml MEM mit 5 % FCS, 1 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin wurden die Zellen im Inkubator weiterkultiviert bis alle Zellen zytopathische Effekte zeigten. Die Zellen wurden dann durch Schaben bzw. Abklopfen wie unter 2.5.1 geerntet, bei 230 xg, 10 min, 4°C abzentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml PBS⁺⁺ resuspendiert. Abschließend wurde durch drei *freeze-thaw*-Zyklen das als sekundärer Adenovirusstock bezeichnete Viruslysate präpariert und bei -70°C gelagert. Zum Abtrennen von Zelltrümmern wurden die sekundären Adenovirusstocks vor der Verwendung bei 345 xg, 10 min, 4°C abzentrifugiert.

2.5.4 Präparation adenoviraler DNA

Für die Charakterisierung der hergestellten Adenoviren wurde die adenovirale DNA aus infizierten 293 Zellen extrahiert und anschließend die Struktur des rekombinanten Adenovirusgenoms durch Restriktionskartierung kontrolliert.

Für die Infektion wurden 293LP Zellen in einer 6-*well* Platte (Nuncleon) ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz bei 37°C, 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden mit einer 1:5 Verdünnung der jeweiligen primären Adenovirusstocks oder einer 1:10 Verdünnung des sekundären Adenovirusstocks, wie unter 2.5.3 beschrieben, infiziert. Die Zellen wurden kultiviert, bis deutlich zytopathische Effekte auftraten. Die 6-*well* Platte wurde 30 min unter der Cleanbench zum Absetzen abgelöster Zellen stehen gelassen und anschließend das Medium vorsichtig mit einer 1000µl-Pipette abgezogen. Pro Napf wurden 500 µl Pronase-Arbeitslösung (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,5 % SDS, 0,5 mg/ml Pronase) zugegeben und für 18 h bei 37°C, 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die hochvisköse Lösung wurde in ein 15 ml Röhrchen (Greiner) überführt, ein Volumen Phenol zugegeben und für 30 min durch Invertieren gemischt. Nach Zugabe von einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde erneut für 15 min durch Invertieren gemischt und zur Phasentrennung 5 min bei 1400 xg, 16°C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgezogen und in ein neues 15 ml Röhrchen überführt. Die Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde wie oben beschrieben zweimal wiederholt. Die DNA wurde anschließend aus dem klaren, wässrigen Überstand nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaOAc pH 7,0 und 2,5 Volumen vorgekühltem (-20°C) absolutem Ethanol für 30 min bei -70°C gefällt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 1400 xg, 4°C wurde das Pellet mit vorgekühltem 70 %igen Ethanol (-20°C) gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Das leicht getrocknete DNA Pellet wurde abschließend in 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA) über Nacht bei 4°C gelöst. Die DNA (virale DNA und Reste von zellulärer DNA) wurde in analytischen Restriktions-spaltungen mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen charakterisiert.

2.5.5 Herstellung CsCl-gereinigter Adenovirusstocks

Für eine Produktion wurden pro Konstrukt jeweils 32 große Zellkulturflaschen (175 cm², Nuncleon) 293LP Zellen ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Die Infektion erfolgte, wie unter 2.5.3 beschrieben, mit einer 1:10-30 Verdünnung der jeweiligen sekundären Adenovirusstocks in PBS mit 2 % FCS in einem Endvolumen von 5 ml pro Zellkulturflasche. Die infizierten Zellen wurden weiterkultiviert bis alle Zellen deutlich zytopathische Effekte zeigten und sich von der Zellkulturoberfläche ablösten. Die

Zellen wurden mit einem Zellschaber oder durch Abklopfen geerntet, bei 230 xg, 4°C für 10 min in 50 ml Röhrchen (Greiner) abzentrifugiert und nach Resuspension der Zellpellets in insgesamt 40 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8 gepoolt. Nach Zentrifugation bei 230 xg, 4°C, 10 min wurde das Zellpellet in 30 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8 resuspendiert und in gleicher Weise erneut gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet bei 230 xg, 4°C, 10 min abzentrifugiert, in 2 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8 resuspendiert und bei -70°C eingefroren. Nach einem *freeze-thaw*-Zyklus wurde 1/10 Volumen Natrium-Desoxycholat (5 % in H₂O) zugegeben. Die Lösung wurde durch Schwenken gemischt und für 30 min auf Eis unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Zu der klaren, hochviskösen Lösung wurden 3 µl Benzonase (Benzon Nuclease, Merck, 10.000 U/ml) zugegeben und für 60-80 Minuten bei RT unter gelegentlichem Schwenken inkubiert, bis die Viskosität deutlich abnahm. Nach Zentrifugation bei 460 xg, 10 min, 4°C wurde der Überstand in neues 15 ml Röhrchen (Greiner) überführt und dabei das Volumen bestimmt. Pro 3,1 ml Virussuspension wurden 1,8 ml gesättigte CsCl-Lösung (gesättigte CsCl-Lösung in 0,1 M Tris/HCl pH 8 bei RT) zugegeben. Die Virussuspension/CsCl-Lösung wurde in Sorvall *Quick-Seal* Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (Kapazität 5,1 ml, Bestell-Nr. 362248) überführt und mit Tris/CsCl-Lösung (0,1 M Tris/HCl pH 8, gesättigtes CsCl, in einem Verhältnis von 3,1:1,8) austariert. Die Röhrchen wurden mit einem *Quick-Seal*-Schweißgerät verschlossen und im TLA 110 Rotor (DuPont) bei 47.000 rpm, 4°C für 13 h in der Ultrazentrifuge TL 100 (DuPont, Sorvall) zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation waren zwei Banden erkennbar. Die untere Virusbande wurde mit einer G23-Kanüle (Becton Dickinson) abgezogen, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und das Volumen bestimmt. Die Lösung wurde mit Tris/CsCl-Lösung (0,1 M Tris/HCl pH 8, gesättigtes CsCl, 3,1:1,8) auf ein Endvolumen von 5,1 ml aufgefüllt, in Sorvall *Quick-Seal* Polyallomer-Zentrifugenröhrchen transferiert, austariert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert.

Nach der zweiten Zentrifugation wurde die Virusbande abgezogen, das Volumen dieser CsCl-gereinigten Adenovirusstocks (*adenoviralen high-titer stocks*) bestimmt und die Virussuspension bis zur Dialyse in Kryoröhrchen bei 4°C gelagert.

2.5.6 Dialyse CsCl-gereinigter Adenovirusstocks

Um CsCl und möglicherweise für dendritische Zellen toxische Substanzen aus den Adenovirusstocks zu entfernen, wurden CsCl-gereinigte Adenovirusstocks dialysiert.

Für die Dialyse wurden Spectra/Por® CE DispoDialyzers® (1 ml Probenvolumen, MWCO 300.000 Dalton, Spectrum® Laboratories) nach dem Protokoll des Herstellers mit Dialysepuffer pH 7 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂) gewaschen, mit 800 µl CsCl-gereinigtem Adenovirusstock befüllt und dreimal (2 h, 4 h, über Nacht) gegen 500 ml Dialysepuffer dialysiert. Anschließend wurde die Virussuspension abgezogen, in ein neues 50 ml Röhrchen (Greiner) überführt und der Spectra/Por® CE DispoDialyzers® erneut mit 800 µl CsCl-gereinigtem Adenovirusstock befüllt und wie beschrieben dialysiert. Die Wiederverwendung der DispoDialyzers® sollte den Verlust an Adenoviruspartikel durch unspezifische Adhäsion an die Celluloseester-Membran verringern. Bei der Dialyse fielen Viren aus, die durch die Veränderung des Dialysepuffers

auf 500 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 1 mM KCl und pH 7,8 und Inkubation über Nacht bei 4°C wieder gelöst werden konnten. Dies wurde durch elektronenmikroskopische Analysen überprüft. Abschließend wurde das Volumen der dialysierten Virussuspension bestimmt und zur Lagerung bei -70°C in Kryoröhrchen aliquotiert.

2.5.7 Bestimmung des Titers der dialysierten CsCl-gereinigten Adenovirusstocks

Die Titer der dialysierten Adenovirusstocks wurden durch Doppelbestimmung nach Infektion von 293LP ermittelt.

In 24-*well* Platten (Nunc) wurden 293LP Zellen ausgesät und bis zur Konfluenz im Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ kultiviert. In PBS mit 2 % FCS wurden von den Virusstocks Verdünnungen von 10⁻³ bis 10⁻¹⁴ angesetzt. Für die Infektion der 293LP Zellen wurde das Medium abgezogen, 200 µl der jeweiligen Verdünnung zu den Zellen pipettiert und für 1 h bei RT auf dem Rocker inkubiert. Anschließend wurde pro Napf 1 ml MEM mit 5 % FCS, 1 % Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin zugegeben und die Zellen bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Die Auswertung und Bestimmung des Titers erfolgte fluoreszenzmikroskopisch am Tag 10 nach der Infektion durch Auszählung der EGFP-positiven, viralen Plaques. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe und des eingesetzten Volumens für die Infektion errechnete sich der Titer in *plaque forming units per ml* (PFU/ml).

2.5.8 Fluoreszenzmikroskopie zum Nachweis der EGFP-Expression

Der Nachweis der EGFP-Expression erfolgte mit einem Standardfluoreszenzmikroskop (Umkehrmikroskop, Zeiss) unter Anregung der Fluoreszenz mit einer Quecksilberdampf-kurzbogenlampe (HBO 50W). Die für die Detektion der EGFP-Fluoreszenz spezifischen Emission wurde durch Verwendung eines FITC-Filtereinsatzes (Bandpaßfilter 450-490, Farbteiler 510, Langpaßfilter 520) erzielt, da EGFP blaues Licht mit einem Maximum bei 490 nm absorbiert und grünes Licht mit einem Maximum von 540 nm emittiert.

2.6 Nachweis der Transgen-Expression

Die Expression der HPV-16 Proteine und Fusionsproteine wurde durch Western-Blot und immunozytochemische Färbungen verifiziert. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle wurde durch immunozytochemische Färbungen nachgewiesen.

2.6.1 Präparation der Zellysate

Für den Nachweis der Expression der HPV-16 Proteine und Fusionsproteine durch Western-Blot wurden 293LP Zellen oder A549 Zellen in Zellkulturflaschen (75 cm² bzw. 175 cm²) ausgesät und bis zur Konfluenz im Inkubator kultiviert. Die Infektion der Zellen erfolgte wie unter 2.5.3 beschrieben mit einer 1:1000 Verdünnung des CsCl-gereinigten Adenovirusstocks oder einer 1:5 Verdünnung der sekundären Adenovirusstocks in PBS mit 2 % FCS. Nach Infektion wurden die Zellen für 2 Tage weiterkultiviert. Die Zellen wurden durch Abklopfen und vorsichtiges Schaben mit dem Zellschaber geerntet, in ein neues 50 ml Röhrchen (Greiner) überführt und bei 460 xg, 10 min, 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen, wie oben abzentrifugiert und

anschließend bei -20°C eingefroren. Nach etwa 15 min wurden die Pellets bei RT aufgetaut und in 600 μl eiskaltem Extraktionspuffer (50 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 % Triton-X100, 0,5 % DOC, 5 mM EDTA) aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20° gelagert.

2.6.2 SDS-Gelelektrophorese

Nach Auftauen der eingefrorenen Zellysate (2.6.1) im 37°C Wasserbad erfolgte deren Zentrifugation bei 10.000 xg, 15 min, 4°C . Das Pellet wurde in 1 ml reduzierenden 5x Laemmli-puffer (320 mM Tris/HCl pH 6,8, 6,5 % SDS, 50 % Glycerin, 6,5 % β -Mercaptoethanol, 0,25 % Bromphenolblau) resuspendiert und für 5 min bei 95°C inkubiert. Der Überstand wurde 1:1 in reduzierendem 5x Laemmli-puffer verdünnt und ebenfalls für 5 min bei 95°C denaturiert.

Tab. 2.3: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele

	SDS-PAGE-Gel		6 M Harnstoff SDS-PAGE-Gel		
	12,5 % Trenngel	5 % Sammelgel	7,5 % Trenngel	15 % Trenngel	5 % Sammelgel
Harnstoff	----	----	4,32 g	4,32 g	1,44 g
AA-Bis ¹	5 ml	0,64 ml	3 ml	6 ml	0,64 ml
Lower-Tris ²	4 ml	----	4 ml	4 ml	----
Upper-Tris ³	----	1 ml	----	----	1 ml
H ₂ O	3 ml	2,36 ml	3,5 ml (ad 12 ml)	0,5 ml (ad 12 ml)	2 ml
TEMED	9,6 μl	6,4 μl	9,6 μl	9,6 μl	9,6 μl
40 % APS ⁴	28,8 μl	20 μl	28,8 μl	28,8 μl	20 μl

¹ AA-Bis: 30 % Acrylamid, 0,75 % BIS-Acrylamid;

² Lower-Tris: 1,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 8,8;

³ Upper-Tris: 0,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 6,7;

⁴ 40 % APS: 400 mg/ml Ammoniumpersulfat in H₂O

Zur Bestimmung der Proteinmengen wurden jeweils 10 μl der Proben auf ein SDS-PAGE-Gel (5 % Sammelgel, 12,5 % Trenngel, siehe Tab. 2.3) gemeinsam mit 10 μl eines *high-range molecular weight* und *low-range molecular weight* Markers (Gibco BRL) aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA in 1x SDS-Laufpuffer (230 mM Tris/HCl, 0,1 % SDS, 80 mM Glycerin, 2 mM EDTA) für ca. 1,5 h bis die Bromphenolblaubande das Gelende erreicht hatte. Die Proteingele wurden anschließend mit Coomassie-Brilliant Blau gefärbt, entfärbt und getrocknet.

Für die Western-Blotanalyse wurden etwa gleiche Proteinmengen auf ein 7,5 % 6 M Harnstoff SDS-PAGE-Gel für den indirekten HPV16 L1-spezifischen Nachweis oder auf ein 15 % 6 M Harnstoff SDS-PAGE-Gel für den indirekten HPV16 E7-spezifischen Nachweis aufgetragen und die Proteine unter gleichen Bedingungen elektrophoretisch getrennt.

2.6.3 Western-Blot

Der Western-Blot wurde im *semi-dry* Verfahren durchgeführt. Das SDS-PAGE Gel sowie die PVDF-Membran wurden für 10 min in *semi-dry* Blotpuffer (20 % v/v Methanol, 192 mM Glycin, 25 mM Tris/HCl) äquilibriert und anschließend im Sandwich-Verfahren zwischen jeweils 2 Lagen in Blotpuffer angefeuchtetem 3MM Papier zusammengelegt. Der Transfer erfolgte für 1,5 h bei 5 mA/cm². Die Membran wurde dreimal 5 min in T-PBS (PBS mit 0,05 % Tween-20) gewaschen und anschließend für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blockpuffer (T-PBS mit 5 % Ovalbumin und 3 % BSA) abgesättigt. Nach drei Waschschritten für 10 min in T-PBS wurde die Membran mit einem 1:1000 in T-PBS mit 3 % Ziegen Serum (Immunex) verdünnten monoklonalen *mouse*-anti-HPV-16 L1 Antikörper (CamVir-1, Research Diagnostics Inc) oder mit einer 1:1000 Verdünnung eines Mixes aus zwei monoklonalen *mouse*-anti-HPV-16 E7 Antikörpern (von R. Tindle, SASVRC) für 1,5 h auf dem Rocker bei RT inkubiert. Die Membran wurde anschließend erneut dreimal in T-PBS für jeweils 10 min gewaschen und für 1,5 h mit einer 1:2000 Verdünnung des sekundären *goat*-anti-*mouse* Antikörpers (Peroxidase (PO)-gekoppelt, Dianova) in T-PBS mit 3 % Ziegen Serum (Immunex) inkubiert. Vor der Visualisierung wurde die Membran erneut dreimal für jeweils 10 min in T-PBS gewaschen. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe des ECL⁺ Westernblotting Detektionssystems (Amersham) nach Herstellerangaben.

2.6.4 Immunozytochemische Färbungen

Die Expression der HPV-16 Sequenzen wurde neben dem Nachweis durch Western-Blot auch durch immunozytochemische Färbungen von infizierten A549 Zellen, murinen sowie humanen dendritischen Zellen verifiziert. Für diese Färbungen wurde das universelle Immunostainingsystem von Immunotech mit alkalischer Phosphatase-gekoppeltem Streptavidin verwendet. Der indirekte Nachweis der Expression der kostimulatorischen Moleküle nach Infektion von A549 Zellen mit den entsprechenden adenoviralen Vektoren erfolgte ebenfalls durch immunozytochemische Färbungen. Für diese Färbungen wurde Streptavidin, gekoppelt mit einem Fluorochrom (Cy3), für den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der kostimulatorischen Moleküle benutzt (Tab. 2.4).

Für die immunozytochemischen Färbungen wurden A549 Zellen in 8er Kammerdeckgläschen (LabTek, Nuncleon) ausgesät und bis zur Konfluenz im Inkubator kultiviert. Bei der Verwendung von murinen oder humanen dendritischen Zellen wurden die Zellen am Tag 4 nach der Isolation wie unter 2.4.8 bzw. 2.4.9 beschrieben geerntet und in Kammerdeckgläschen (LabTek, Nuncleon) umgesetzt. Die Infektion der Zellen erfolgte wie unter 2.5.3 beschrieben mit einer 1:1000 Verdünnung des CsCl-gereinigten Adenovirusstocks oder einer 1:5 Verdünnung der sekundären Adenovirusstocks in PBS mit 2 % FCS. Nach der Infektion für 1 h auf dem Rocker wurden die Zellen für 2 Tage weiterkultiviert. Für die immunozytochemischen Färbungen wurden die Zellen durch die direkte Zugabe einer Paraformaldehydlösung (18 %ige Stammlösung in PBS, Endkonzentration 3 %) ins Medium und Inkubation für 30 min bei RT fixiert.

Für einige immunozytochemische Färbungen von murinen dendritischen Zellen wurden Cytospins verwendet. Dafür wurden die Zellen vor der Fixierung aus den Kammerdeckgläschen (LabTek, Nuncleon) in Eppendorfgefäße überführt, zentrifugiert (230 xg, 10 min,

RT) und in 100 µl PBS mit 10 % FCS resuspendiert. Die Cytospins wurden auf Objektträger der Größe 76 x 26 mm in einer Cytospin 3 Zentrifuge (Shandon, Life Science International) bei 162 xg für 10 min durchgeführt und luftgetrocknet. Anschließend wurden die Zellen durch die Zugabe einiger Tropfen einer 3 %igen Paraformaldehydlösung und Inkubation für 30 min bei RT fixiert.

Tab. 2.4: Verwendete Antikörper für die immunozytochemischen Färbungen. Die Verdünnungen wurden in PBS mit 2 % FCS und 5 % Ziegenserum angesetzt.

Ziel-protein	primärer Antikörper	sekundärer Antikörper	Streptavidin
HPV-16 E7	<i>mouse</i> anti-HPV-16 E7 (6D und 8F von R. Tindle, SASVRC), 1:200 als 1:1 Mix	<i>goat</i> anti- <i>mouse</i> IgG-Biotin (Dianova), 1:1000	Streptavidin-alkalische Phosphatase-Lösung (Immunotech)
HPV-16 L1	<i>mouse</i> anti-HPV-16 L1 (CamVir, Research Diagnostics Inc), 1:200		
humane MHC II	<i>mouse</i> anti- <i>human</i> HLA-DR-DP-DQ (IQU9, Cymbus Biotechnology LTD), 1:100		
murine MHC II	<i>rat</i> anti- <i>mouse</i> I-A ^d /I-E ^d -Biotin (2G9, Pharmingen), 1:100		
murine CD40	<i>rat</i> anti- <i>mouse</i> CD40-Biotin (3/23, Pharmingen), 1:100		Streptavidin-Cy3 (Dianova), 1:400
murine CD40L	<i>hamster</i> anti- <i>mouse</i> CD40L-Biotin (MR1, Pharmingen), 1:100		
murine RANK	<i>goat</i> anti- <i>mouse</i> RANK-Biotin (R&D Systems), 1:100		
murine RANKL	<i>goat</i> anti- <i>mouse</i> RANKL/TRANSE-Biotin (R&D Systems), 1:100		
murine 4-1BBL	<i>rat</i> anti- <i>mouse</i> 4-1BBL (TKS-1, Pharmingen), 1:100	<i>goat</i> anti- <i>mouse</i> IgG-Biotin (Dianova), 1:1000	

Nach der Fixierung wurden die Zellen durch Inkubation in PBS mit 3 % Paraformaldehyd und 0,05 % Triton-X 100 für 5-7 min bei RT permeabilisiert. Durch die Zugabe eines Tropfen des Protein Blocking Agens aus dem Immunostainingsystems (Immunotech) wurden die freien Bindungsstellen und Fc-Rezeptoren für 10 min bei RT abgesättigt. Danach folgte die Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen primären Antikörper (Tab. 2.4) verdünnt in PBS mit 2 % FCS und 5 % Ziegenserum (Immunex) für 1 h bei RT. Anschließend wurden die Zellen dreimal jeweils für 5 min mit PBS gewaschen und falls notwendig für 30 min mit dem sekundären Antikörper (Tab. 2.4) inkubiert, gefolgt von drei fünfminütigen Waschschritten mit PBS. Nun wurden die Zellen für 45 min bei RT mit Streptavidin, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase oder Cy3, inkubiert und dann erneut dreimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen. Die Chromogen-/Substratentwicklung für die Färbungen mit dem universellen Immunostainingsystem (Immunotech) sowie die Gegenfärbung der Zellen mit Hämatoxilin erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Abschließend wurden die Präparate mit einem Standardfluoreszenzmikroskop (Umkehrmikroskop, Zeiss) unter Anregung der Fluoreszenz mit einer Quecksilberdampfkurzbogenlampe (HBO 50 W) für die Cy3-Färbungen bzw. im Durchlicht für die mit dem Immunostainingsystem durchgeführten Färbungen untersucht und dokumentiert.

2.6.5 FACS-Messung (Durchflußzytometrie)

Zur Charakterisierung der murinen dendritischen Zellen wurde die Expression von Oberflächenproteinen mittels Durchflußzytometrie (FACS) analysiert. Für die Färbungen wurden die nicht adhärenenten und leicht adhärenenten Zellen aus den Kulturen der murinen dendritischen Zellen (2.4.8) in ein 50 ml Röhrchen (Greiner) überführt und für 10 min bei 230 xg 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dreimal mit 5 ml RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 0,5 ml RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS resuspendiert und gezählt. 5×10^5 Zellen wurden in einen Napf einer 96-well Platte mit rundem Boden (Nuncleon) pipettiert und für 5 min bei 130 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde ausgeschlagen und das Zellpellet in 100 µl/Napf der jeweiligen Antikörperverschüttung (Tab. 2.5) in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS resuspendiert und 1 h auf Eis im Dunkeln inkubiert.

Tab. 2.5: Für die FACS-Messung verwendete Antikörper. Die Verdünnungen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS angesetzt.

Antikörper	Firma	Markierung	Klon	Verdünnung
anti-mouse CD11c	Becton Dickinson	PE	HL3	1:100
anti-mouse CD11c		APC	HL3	1:200
anti-mouse I-A ^d /I-E ^d		Biotin	2G9	1:100
anti-mouse CD80		PE	16-10A1	1:200
anti-mouse CD86		Biotin	GL1	1:200

Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 200 µl PBS pro Napf gewaschen, indem sie zentrifugiert (5 min, 130 xg, 4°C), der Überstand ausgeschlagen und die Zellen wieder in 200 µl/Napf PBS resuspendiert wurden. Wenn der primäre Antikörper biotinyliert war, wurden die Zellen danach mit 100 µl/Napf der verdünnten Streptavidin-Cy5 (1:100 Verdünnung in RPMI 1640 mit 10 % FCS, Dianova) für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen. Nach Beendigung aller Antikörper- und Streptavidinfärbungen mit den anschließenden Waschschritten wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl/Napf PBS mit 4 % Paraformaldehyd resuspendiert und für 30 min bei RT im Dunkeln fixiert. Die Zellsuspension wurde dann in ein FACS-Polystyrolröhrchen (Falcon) überführt und mit PBS auf ein Endvolumen von 400 µl eingestellt.

Die Charakterisierung der gefärbten dendritischen Zellen wurde am FACS-Gerät (Becton Dickinson Vantage mit Cell-Quest Software) durchgeführt, wobei 10.000 den Parametern entsprechende Zellen ausgezählt wurden. Zur Darstellung der FACS-Daten wurden die Signale in einem zweidimensionalen System als *dotplot*-Diagramm gezeigt. Die Auswertung erfolgte mittels eines Schwellenwertes. Dazu wurden ungefärbte Zellen sowie

Zellen, die nur mit dem sekundären Antikörper gefärbt wurden, als Negativkontrolle verwendet. Basierend auf der Negativkontrolle konnte in das System ein Quadrant gelegt und die Verteilung der *dotplots* quantifiziert werden.

2.7 Methoden zur Untersuchung der Immunantwort in Mäusen

Für die *in vivo* Experimente zur Untersuchung der HPV-16-spezifischen Immunantwort wurden A2.1K^b-transgene Mäuse mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen oder einem konventionellen Peptid-Vakzin immunisiert. Die A2.1K^b-transgenen Mäuse exprimieren ein chimäres HLA-Molekül bestehend aus der α -1 und α -2 Domäne des HLA A*0201 und der α -3 Domäne von H-2K^b in einem H-2^b Hintergrund²⁶³. Alle Mäuse wurden unter speziellen Pathogen-freien Bedingungen gehalten, innerhalb eines Versuchs wurden Mäuse des gleichen Geschlechts verwendet, die zwischen 7-15 Wochen alt waren.

2.7.1 Peptid- und Protein-Antigene

Im Rahmen der immunologischen Arbeit wurden verschiedene Peptide verwendet, deren Sequenz mit den H-2D^b sowie A2.1-restringierten CTL-Epitopen aus HPV-16 E7 und L1 übereinstimmten (Tab. 2.6). Diese Peptide wurden zur Immunisierung der Mäuse mit dem Peptid-Vakzin, zur *in vitro* Restimulation von Milzzellen sowie zur Beladung von Zellen für die zelluläre *in vitro* Restimulation und für den ⁵¹Chromium-Zytotoxizitätsassay eingesetzt. Alle Peptide wurden mittels HPLC analysiert und Stocks mit 10 mg/ml angesetzt, die bei -20°C gelagert wurden.

Tab. 2.6: Verwendete Peptide, die HPV-16-spezifische CTL-Epitope repräsentieren.

Peptid/ CTL-Epitop	Protein	Aminosäuresequenz	Hersteller	MHC I Restriktion	Lösung- mittel
8Q	HPV-16 E7	⁴⁴ QAEPDRAHYNIVTFCKCD ⁶²	QIMR	H-2D ^b	H ₂ O
597		⁸⁶ TLGIVCPI ⁹³	Mimotopes	HLA A*0201	DMEM
598		⁸² LLMGTLGIV ⁹⁰			DMSO
599		¹¹ YMLDLQPETT ²⁰			
L1	HPV-16 L1	³²³ ICWGNQLFV ³³¹			

Die Peptide der CTL-Epitope 597, 598, 599 und L1 sind minimale A2.1-restringierte zytotoxische T-Lymphozyten- (CTL-) Epitope^{262,286}. 8Q enthält neben dem H-2D^b-restringierten CTL-Epitop²⁶¹ ein mit dem CTL-Epitop überlappendes T-Helfer-Epitop, ⁴⁸DRAHYNI⁵⁴, sowie ein B-Zell-Epitop (⁴⁴QAEPD^{48,298}).

Zur Überprüfung der Prozessierung und Präsentation der A2.1-restringierten CTL-Epitope in dem A2.1K^b-transgenen Modell wurde aufgereinigtes HPV-16 E7-Protein von G. Fernando (CICR, Brisbane) zur Verfügung gestellt.

2.7.2 Immunisierung mit dendritischen Zellen

Für die Immunisierung mit dendritischen Zellen wurden die unter 2.4.8 gewonnenen murinen dendritischen Zellen verwendet. Dafür wurden die nicht adhärenen und leicht adhärenen Zellen in 50 ml Röhrchen (Greiner) überführt und für 10 min bei 230 xg RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde insgesamt dreimal mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend die Zelldichte mit PBS auf 5×10^6 /ml eingestellt. Für die Immunisierung der Mäuse (4 Mäuse pro Gruppe) wurden pro Maus 100 µl der dendritischen Zellsuspension, entspricht 5×10^5 dendritischer Zellen pro Maus, mit einer sterilen 1ml-Spritze mit einer G21-Kanüle (Becton Dickinson) subkutan an der Schwanzbasis injiziert. Falls nicht anders angegeben wurde 10 Tage nach der Immunisierung mit der Analyse induzierten HPV-16-spezifischen Immunantwort begonnen.

In einigen Versuchen wurden dendritische Zellen statt subkutan intramuskulär am Hinterbein injiziert. Dafür wurden die Mäuse vor der Immunisierung durch die Injektion (intraperitoneal) eines Betäubungsmittelmixes (300-400 µl pro Maus) narkotisiert. Der Betäubungsmittelmix setzte sich wie folgt zusammen:

0,5 ml Ketamil	(100 mg/ml Ketamine, Ilium)
0,1 ml Xylazine	(20 mg/ml Xylazine, Ilium)
5,4 ml H ₂ O	

2.7.3 Immunisierung mit dem Peptid-Vakzin als Standard bzw. mit dem HPV-16 E7-Protein

In jedem Experiment wurde eine Gruppe von Mäusen (4 Mäuse pro Gruppe) subkutan an der Schwanzbasis mit 100 µl pro Maus eines konventionellen Peptid-Vakzin immunisiert. Diese Immunisierung mit einem Peptid-Vakzin diente zur Kontrolle der immunologischen Methoden, die für die Verwendung eines Peptid-Vakzin etabliert und optimiert wurden, sowie als Vergleich zu der Immunisierung mit dendritischen Zellen. Das Peptid-Vakzin setzte sich pro Maus wie folgt in 100 µl PBS zusammen:

50 µg des jeweiligen Peptides (Tab. 2.6) bzw. HPV-16 E7-Protein
10 µg Quil A ²⁹⁹
0,25 ng Tetanus Toxid (CSL)

2.7.4 *In vitro* Restimulation

Im Gegensatz zum IFN γ -ELISPOT (2.7.6) ist die Sensitivität des ⁵¹Chromium-Zytotoxizitätsassays (2.7.5) nicht hoch genug, um die spezifische Zytotoxizität der T-Lymphozyten gegen ein beliebiges CTL-Epitop direkt *ex vivo* zu messen. Durch eine *in vitro* Restimulation der Milzzellen mit dem spezifischen Peptid kann durch die spezifische Aktivierung der sog. *memory* T-Zellen zur Proliferation die Frequenz der spezifischen CTLs erhöht und deren Funktionalität und Spezifität untersucht werden.

Für die *in vitro* Restimulation wurden zwei unterschiedliche Protokolle verwendet. Im Standardprotokoll wurden die Milzzellen nach der Depletion der adhärenen professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) zellulär restimuliert (2.7.4.1). Für die zelluläre Restimulation wurden Stimulatorzellen zugegeben, die als artifizielle

Antigen-präsentierende Zellen fungierten. Als Stimulatorzellen wurden die konstitutiv HPV-16 E7-exprimierenden EL4.E7 oder EL4.A2.1 Zellen, die zuvor mit dem Peptid des CTL-Epitopes beladen wurden, verwendet. Für die *in vitro* Restimulation für die A2.1-restringierten HPV-16 spezifischen CTL-Epitope L1 und 597 wurde das Standardprotokoll modifiziert und die Milzzellen ohne Depletion der APC durch die Zugabe des Peptides restimuliert (2.7.4.2).

2.7.4.1 Zelluläre *in vitro* Restimulation

Falls nicht anders angegeben wurde 10 Tage nach der Immunisierung der Mäuse mit der *in vitro* Restimulation begonnen. Dafür wurde die Milz der Mäuse isoliert und mit Hilfe eines Zellsiebes (70 µm Porendurchmesser, Becton Dickinson) von der Milz eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 230 xg RT zentrifugiert und das Pellet dreimal mit DMEM gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 30 ml DMEM mit 10 % FCS resuspendiert, die Zellsuspension für die APC-Depletion in eine 175 cm² Zellkulturflasche (Nunc) überführt und für 90 min im Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Mit dieser Depletion sollten die adhären APCs (dendritische Zellen und Makrophagen) entfernt werden. Während der APC-Depletion wurde mit der Präparation der Stimulatorzellen (EL4.E7 oder EL4.A2.1) begonnen. Dafür wurden die Zellen zuerst mit 20.000 rad bestrahlt, um die Proliferation der Zelllinie während der sechstägigen Restimulationsphase zu verhindern. Anschließend wurden die bestrahlten Zellen dreimal mit DMEM gewaschen. Für die Peptidbeladung wurden die EL4.A2.1 Zellen in 1-5 ml DMEM mit 10 % FCS resuspendiert und nach Zugabe von 10 µg/ml des Peptides wurden die Zellen für 90 min im Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Peptidbeladung wurden die Zellen dreimal mit DMEM gewaschen und anschließend die Zelldichte der EL4.E7 und Peptid-beladenen EL4.A2.1 auf 1x10⁶/ml eingestellt.

Nach der APC-Depletion durch Entfernen der adhären Zellen wurden die Milzzellen in ein 50 ml Röhrchen (Greiner) überführt und die Zelldichte auf 1x10⁷/ml eingestellt. Die zelluläre *in vitro* Restimulation erfolgte in einem Verhältnis von Milzzellen zu bestrahlten Stimulatorzellen von 10:1 in 24-well Platten (Nunc) mit 2 ml/Napf für sechs Tage im Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂.

2.7.4.2 *In vitro* Restimulation ohne APC-Depletion durch Zugabe des Peptides

Wie zuvor für die zelluläre *in vitro* Restimulation beschrieben, wurde, falls nicht anders angegeben, 10 Tage nach der Immunisierung der Mäuse die Milz der Mäuse isoliert und mit Hilfe eines Zellsiebes (70 µm Porendurchmesser, Becton Dickinson) von der Milz eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 230 xg RT zentrifugiert und das Pellet dreimal mit DMEM gewaschen. Für die *in vitro* Restimulation ohne APC-Depletion durch Zugabe des freien Peptides wurden die Milzzellsuspensionen nach dreimaligem Waschen in 10 ml DMEM mit 10 % FCS resuspendiert, die Zelldichte auf 5x10⁶/ml eingestellt und das jeweilige Peptid in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Die *in vitro* Restimulation erfolgte in 24-well Platten (Nunc) mit 2 ml/Napf für 6 Tage im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂.

2.7.5 ⁵¹Chromium-Zytotoxizitätsassay (CTL-Assay)

Der CTL-Assay erfolgte nach der sechstägigen *in vitro* Restimulation der isolierten Milzzellen. Im CTL-Assay wurden die restimulierten Milzzellen (Effektorzellen) mit den verschiedenen ⁵¹Cr-markierten Targetzellen im Verhältnis von 40:1 und 10:1 in 96-*well* Platten in 200 µl/Napf für 6 h inkubiert und anschließend die aus Targetzellen freigesetzte Radioaktivität als Maß der Zytotoxizität bestimmt. Als Targetzellen wurden EL4.E7, 8Q-, 598-, 597- oder L1-beladene EL4.A2.1 sowie unbeladene EL4-A2.1 verwendet.

Für die Präparation der radioaktiv markierten Targetzellen wurden jeweils $1-1,5 \times 10^6$ Zellen in ein 15 ml Röhrchen (Greiner) überführt und 10 min bei 230 xg RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml DMEM resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 230 xg, RT). Das Zellpellet wurde in 100 µl DMEM resuspendiert und das jeweilige Peptid mit einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben. Zur radioaktiven Markierung der Targetzellen wurden die Zellen für 90 min mit Na₂⁵¹CrO₄ (100 µCi pro $1-1,5 \times 10^6$ Zellen, ICN Biomedicals) im Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 8 ml DMEM mit 10 % FCS in jedes 15 ml Röhrchen pipettiert und dann mit Hilfe einer Pasteurpipette mit 1 ml FCS unterlegt. Nach der Zentrifugation (8 min, 230 xg, RT) wurde der Überstand ohne das FCS entfernt und das 15 ml Röhrchen zweimal mit 1 ml DMEM gewaschen ohne das Zellpellet unter dem FCS zu resuspendieren. Das FCS wurde nach dem zweiten Waschschriff entfernt und das Zellpellet in 1 ml DMEM mit 10 % FCS resuspendiert. Anschließend wurde die Zelldichte auf 1×10^5 /ml eingestellt.

Für die Präparation der Effektorzellen wurden die restimulierten Milzzellen von der 24-*well* Platte in ein 50 ml Röhrchen (Greiner) überführt und für 10 min bei 230 xg RT zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml DMEM gewaschen und erneut wie oben zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml DMEM mit 10 % FCS resuspendiert und die Zelldichte auf 4×10^6 /ml eingestellt. Von der Zellsuspension mit 4×10^6 Zellen/ml für das 40:1 Effektor zu Target Verhältnis wurde die Zellsuspension für das 10:1 Verhältnis angesetzt.

Der CTL-Assay wurde dann in 96-*well* Platten mit rundem Boden (Nunc) angesetzt, indem zuerst 100 µl Targetzellen (1×10^4 Zellen) mit Hilfe einer Multikanalpipette pro Napf vorgelegt werden. Für die Bestimmung der spontanen ⁵¹Cr-Freisetzung der Targetzellen wurde zu diesen Nöpfen jeweils 100 µl DMEM mit 10 % FCS pipettiert. Zur Bestimmung der maximalen ⁵¹Cr-Freisetzung wurde zu den entsprechenden Nöpfen je 100 µl PBS mit 10 % SDS gegeben. Anschließend wurden pro Napf 100 µl Effektorzellen für das 40:1 (4×10^5 Effektorzellen) oder 10:1 (1×10^5 Effektorzellen) Verhältnis von den entsprechenden Effektorzellsuspension pipettiert. Die 96-*well* Platten wurden für 5 min bei 130 xg RT zentrifugiert und für 6 h bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die 96-*well* Platten erneut für 5 min bei 130 xg RT zentrifugiert. Zur Bestimmung der aus den Targetzellen freigesetzten Radioaktivität wurden von jedem Napf 100 µl vom Überstand in ein β-Counterröhrchen (Perkin Elmer) überführt und die Radioaktivität mit einem β-Counter (Wallac) bestimmt. Die spezifische Zytotoxizität (% Lyse der Targetzellen) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{(\bar{x} \text{ der experimentellen } ^{51}\text{Cr Freisetzung} - \bar{x} \text{ der spontanen } ^{51}\text{Cr Freisetzung})}{(\bar{x} \text{ der maximalen } ^{51}\text{Cr Freisetzung} - \bar{x} \text{ der spontanen } ^{51}\text{Cr Freisetzung})} \times 100$$

2.7.6 IFN γ -ELISPOT

Die HPV-16-spezifische T-Zellantwort wurde neben dem CTL-Assay auch durch den IFN γ -ELISPOT (*IFN γ enzyme-linked immunospot assay*) analysiert. Dieser Assay erlaubt die direkte, *ex vivo* Analyse der spezifischen IFN γ sekretierenden zytotoxischen T-Lymphozyten ohne vorherige *in vitro* Restimulation zur Aktivierung der spezifischen *memory* T-Zellen, da dieser Assay deutlich sensitiver als der CTL-Assay ist. In Rahmen der Versuche wurde jeweils ein *ex vivo* IFN γ -ELISPOT am Tag der *in vitro* Restimulation durchgeführt, sowie ein zweiter IFN γ -ELISPOT nach der sechstägigen Restimulation zur Verifizierung der Daten aus dem CTL-Assay.

Zuerst wurden die Näpfe der 96-well ELISPOT-Platte (Millipore Multiscreen-HA) mit 0,6 μ g/Napf des monoklonalen anti-*mouse* IFN γ Antikörpers (R4-6A2, Becton Dickinson) für 16-20 h bei 4°C beladen. Nach der Beladung wurde die Antikörperlösung entfernt und freie Bindungsstellen durch die Zugabe von 200 μ l/Napf DMEM mit 10 % FCS für 2 h bei RT geblockt. Anschließend wurde das Medium entfernt und pro Napf 100 μ l DMEM mit 10 % FCS und 100 U/ml rekombinanten humanen IL-2 (Sigma) gegeben. Abhängig vom Ansatz wurde zu den entsprechenden Näpfen noch das jeweilige Peptid des untersuchten CTL-Epitopes in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml pipettiert.

Für den *ex vivo* IFN γ -ELISPOT wurden die Milzzellen direkt ohne Depletion der adhärennten professionellen APC für die *in vitro* Restimulation (2.7.3) verwendet. Es wurden 5×10^6 Milzzellen aus der 30 ml Zellsuspension in ein neues 15 ml Röhrchen (Greiner) überführt und die Zelldichte mit DMEM mit 10 % FCS auf 5×10^6 /ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 100 μ l in jeden Napf mit 5×10^5 Zellen/Napf pipettiert bzw. 50 μ l in jeden Napf mit $2,5 \times 10^5$ Zellen/Napf. Zu den Ansätzen mit $2,5 \times 10^5$ Zellen/Napf wurden noch 50 μ l DMEM mit 10 % FCS zugegeben.

Für den IFN γ -ELISPOT mit APC depletierten, EL4.E7 oder EL4.A2.1 + Peptid restimulierten Milzzellen bzw. ohne APC-Depletion durch Zugabe des Peptides restimulierten Milzzellen wurden die auch für den CTL-Assay benutzten Effektorzellen mit 4×10^6 Zellen/ml verwendet. Die Zelldichte wurde mit DMEM mit 10 % FCS auf 2×10^5 /ml eingestellt. Pro Napf wurden 2×10^4 bzw. 1×10^4 Zellen eingesetzt.

Die ELISPOT-Platten wurden anschließend für 20 h im Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert, bevor mit der Detektion der IFN γ sekretierenden Zellen begonnen wurde. Nachdem die Zellsuspension entfernt war, wurden die Löcher sechsmal mit 200 μ l PBS mit 0,02 % Tween-20 (Promega) pro Napf gewaschen. Danach wurden die Näpfe mit 0,15 μ g biotinylierten monoklonalen anti-*mouse* IFN γ Antikörper XMG1.2 (Becton Dickinson) in PBS mit 0,02 % Tween-20 und 0,1 mg/ml Ovalbumin (Sigma) pro Napf für 3 h bei RT inkubiert und anschließend wieder sechsmal mit 200 μ l PBS mit 0,02% Tween-20 pro Napf gewaschen. Die Näpfe wurden dann mit jeweils 75 μ l einer 1:400 Streptavidin-alkalische Phosphatase (Becton Dickinson) Verdünnung in PBS mit 0,02 % Tween-20 und 0,1 mg/ml Ovalbumin für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden die ELISPOT-Platten dreimal mit 200 μ l/Napf PBS gewaschen. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurde eine BCIP/NPT-Substrattablette (Sigma) in 10 ml H₂O gelöst, 50 μ l in jeden Napf pipettiert und bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Inkubation bei 37°C wurde beendet, wenn deutlich Spots auf der Membran erkennbar waren. Zur Entfernung des Substrates wurden die

Platten gründlich mit Leitungswasser gewaschen. Die ELISPOT-Platten wurden im Dunkeln getrocknet.

Die Auswertung der IFN γ -ELISPOT-Platten erfolgte mit Hilfe eines automatischen ELISPOT-Readers von AID (Autoimmun-Diagnostika). Die Berechnung der spezifischen IFN γ sekretierenden Zellen/10⁶ Milzzellen erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{(\bar{x} \text{ der Spots mit Peptid} - \bar{x} \text{ der Spots ohne Peptide})}{\text{Anzahl der Zellen pro Loch}} \times 10^6$$

2.7.7 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)

Zur Untersuchung, ob die Immunisierung der Mäuse mit den genetisch modifizierten dendritischen Zellen neben einer zellulären T-Zellantwort auch eine humorale B-Zellantwort gegen das HPV-16 L1-Protein induzierten, wurde das Vorkommen von HPV-16 L1-spezifischen Antikörpern im Serum der Mäuse durch einen spezifischen ELISA untersucht.

Von den immunisierten Mäusen wurden bis zu 300 μ l Blut aus der Schwanzvene isoliert. Das Blut wurde für 10 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, und danach das Serum in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Bis zur Verwendung wurde das Serum bei -20°C gelagert.

Als Positivkontrolle diente Serum von Mäusen, die zweimal subkutan mit 10 μ g HPV-16 L1 VLPs in PBS von M. Müller (siehe Müller et al.²⁸²) immunisiert wurden. Die zweite Immunisierung erfolgte zwei Wochen nach der ersten. Eine Woche nach der zweiten Immunisierung der Mäuse wurde Blut aus der Schwanzvene isoliert.

Für den L1-spezifischen ELISA wurden die 96-well Maxisorb-Mikrotiterplatten (Nunc) mit 50 μ l/Napf aufgereinigten HPV-16 L1 VLPs in einer 1:200 Verdünnung in PBS durch Inkubation über Nacht bei 4°C beschichtet. Als Negativkontrolle dienten mit PBS behandelte Platten. Die VLP-Verdünnung bzw. das PBS wurden ausgeschlagen und freie Bindungsstellen durch Zugabe von 150 μ l/Napf PBS mit 0,05 % Tween-20 (Promega) und 3 % igem fettarmen Milchpulver (Diploma) für 1 h bei 37°C abgesättigt. Danach wurden die Platten dreimal mit PBS mit 0,05 % Tween-20 gewaschen und mit 50 μ l/Napf 1:100, 1:1000 bzw. 1:10.000 Verdünnungen des Serums in PBS mit 0,05 % Tween-20 für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Platten fünfmal mit PBS mit 0,05 % Tween-20 gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit 50 μ l/Napf des sekundären Antikörpers (1:1000 *sheep-anti-mouse* IgG, Peroxidase (PO)-gekoppelt, Silenius/AMRAD) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen (fünfmal mit PBS + 0,05 % Tween-20) erfolgte die abschließende Färbung mit ABTS (2,2'-Azinobis[3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsure] Diammoniumsalz, Sigma). Dafür wurde ABTS (1 mg/ml) in ABTS-Puffer (80 mM Zitronensäure, 100 mM Na₂HPO₄, pH 4) gelöst, mit 3,6 % H₂O₂ versetzt und 50 μ l des Substrates zu jedem Napf pipettiert. Nach einer Inkubation von 10 bis 20 min wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm mit einem automatischen ELISA-Reader gemessen.

2.8 Statistische Berechnungen

Zur Bestimmung der Signifikanz von Unterschieden der CTL-Aktivität und der Anzahl an $\text{INF}\gamma$ sekretierenden Zellen wurde der unabhängige Student's t-Test herangezogen, wobei ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant angesehen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung und Charakterisierung rekombinanter Adenoviren mit HPV-16 Sequenzen

Ein Ziel dieses Teils der Arbeit war die Generierung rekombinanter Adenoviren, die HPV-16-spezifische Proteine codieren, und für die genetische Modifikation dendritischer Zellen für einen immuntherapeutischen Ansatz verwendet werden sollten. Da diese Arbeit Bestandteil des Strategiefonds „Impfstoff gegen Krebs – Infektionsabwehr und Krebsprävention“ mit dem Ziel der Entwicklung von prophylaktischen oder therapeutischen Vakzinen gegen HPV-16 assoziierte Tumore war, wurden für die verschiedenen beteiligten Gruppen bereits charakterisierte Gene, die HPV-16 Proteine (E7 und L1) bzw. Fusionsproteine (L1/E7₁₋₆₀ und L1/E7) codieren, bereitgestellt (siehe 3.1.1).

Mit Hilfe der rekombinanten Adenoviren sollte die Effizienz genetisch modifizierter dendritischer Zellen als eine Immunisierungsmethode zur Initiation einer therapeutischen Immunantwort gegen HPV-16 induzierte Tumore untersucht werden. Das HPV-16 E7-Protein stellt ein geeignetes Zielprotein für immuntherapeutische Ansätze dar, da es für die Aufrechterhaltung des transformierten, immortalisierten Phänotyps notwendig ist³²⁻³⁵, konstitutiv in HPV-16-infizierten Zellen exprimiert wird und identifizierte T-Zellepitope (CTL-Epitope) enthält^{261,262}. Aus Sicherheitsaspekten wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht das Wildtyp-HPV-16 E7 sondern eine E7-Genvariante (E7mut)²⁹¹ des Onkogens verwendet (siehe Abb. 3.1 A), da ein potentiell Onkogen nicht in einen human-infektiösen Vektor kloniert werden sollte. Durch die Modifikationen in E7mut entsteht ein im Vergleich zum Wildtyp-E7 instabileres Protein mit einer deutlich reduzierten Transformationsfähigkeit²⁹¹.

Durch die Kombination von E7 mit dem späten HPV-16 Protein L1, der Hauptkomponente der Viruspartikel, könnte dem therapeutischen Ansatz gegen HPV-16 E7 auch eine prophylaktische Komponente zugefügt werden. Die Expression von HPV-16 L1 führt in einem *self-assembling* Prozeß zur Bildung von *virus-like-particle*²⁸¹, die eine humorale Immunantwort induzieren²⁸². Diese neutralisierenden L1-spezifischen Antikörper könnten die Virusvermehrung und die erneute Infektion mit HPV-16 verhindern^{283,284}.

Die Herstellung der rekombinanten Adenoviren erfolgte mit dem in der Arbeitsgruppe Lindenmaier/Dittmar entwickeltem adenoviralen Cosmidvektorsystem. Die Integration des adenoviralen Genoms in einen Cosmidvektor erlaubt die einfache Manipulation des adenoviralen Genoms durch konventionelle molekularbiologische Methoden. Die jeweiligen Expressionskassetten können somit sehr effizient in die deletierte E1-Region des adenoviralen Cosmidvektors inseriert werden (siehe 3.1.2). Durch die Deletion der E1-Region, deren Proteine für die adenovirale DNA-Replikation essentiell sind (siehe 1.5.1), sind die mit diesem System generierten adenoviralen Vektoren in nicht-permissiven Zellen replikationsdefizient. Auf diese Weise wurden adenovirale Cosmide konstruiert, welche die HPV-16 Sequenzen enthielten.

3.1.1 Verwendete HPV-16 Sequenzen

Als Teil des Strategiefonds „Impfstoff gegen Krebs – Infektionsabwehr und Krebsprävention“ wurden zu Beginn der Arbeit von L. Gissmann (DKFZ, Heidelberg) im Rahmen anderer Projekte bereits gut charakterisierte DNAs für die HPV-16 Proteine E7 und L1 sowie für die Fusionsproteine L1/E7₁₋₆₀ und L1/E7 zur Verfügung gestellt (Abb. 3.1).

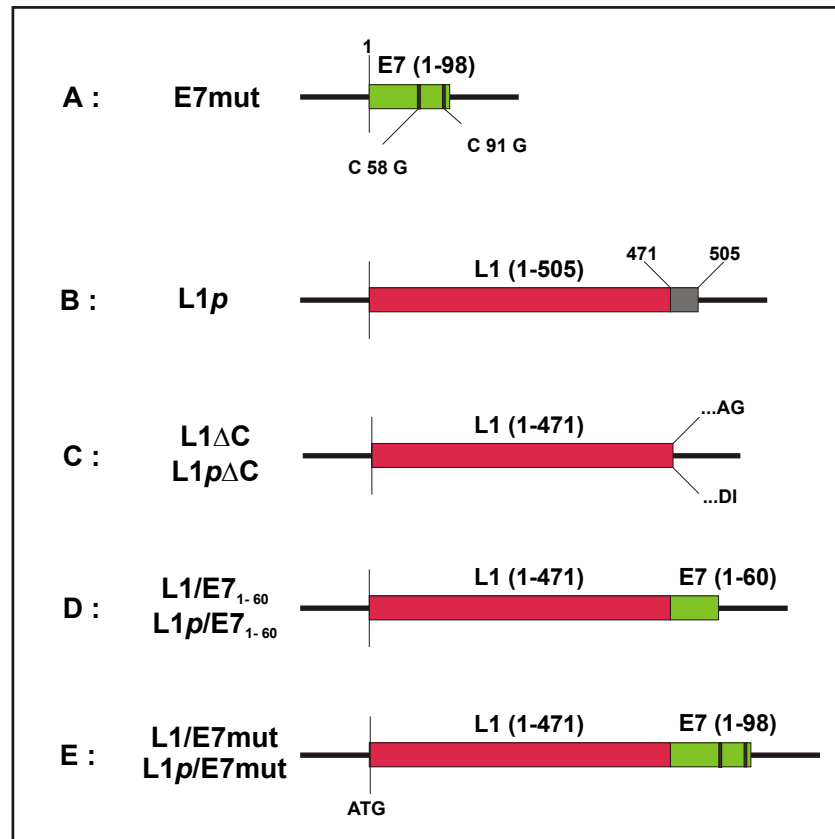


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der verwendeten HPV-16 Sequenzen. (A) Die HPV-16 E7 Variante E7mut²⁹¹ mit reduzierter Transformationsfähigkeit bestehend aus dem gesamten E7 (98 AS) und den beiden Mutationen (C→G) der Codons 58 und 91. (B) Das gesamte HPV-16 L1 (505 AS) mit Pflanzenoptimierten Codons (L1p). (C) Die HPV-16 L1 Konstrukte mit 34 AS-Deletion am C-Terminus mit natürlichen HPV-16 Codons (L1ΔC) bzw. Pflanzenoptimierter *codon usage* (L1pΔC) und dem Unterschied in den letzten beiden AS (AG in L1ΔC bzw. DI in L1ΔC). (D) HPV-16 L1/E7₁₋₆₀ Konstrukte mit den ersten 60 AS von HPV-16 E7 am 34 AS deletierten C-Terminus von L1 (471 AS) sowohl mit natürlichen HPV-16 L1 Codons (L1/E7₁₋₆₀) als auch mit Pflanzenoptimierten Codons (L1p/E7₁₋₆₀). (E) L1/E7mut-Fusionskonstrukte mit der natürlichen HPV-16 L1 *codon usage* (L1/E7mut) sowie mit Pflanzenoptimierter *codon usage* (L1p/E7mut) bestehend aus dem gesamten E7mut (98 AS) am C-Terminus des deletierten L1 (471 AS).

Die DNA-Sequenzen für all diese HPV-Proteine und Fusionsproteine beruhen auf dem HPV-16 Isolat 114/K²⁹⁰ und besitzen die natürlichen HPV-16 Codons bzw. eine für die Expression in Pflanzenoptimierte *codon usage*²⁹². In den Genen für HPV-16 E7mut (Abb. 3.1 A) und L1/E7mut bzw. L1p/E7mut (Abb. 3.1 E) wurden die Codons 58 und 91 für Cystein zu Glycin mutiert (Codon 58 TGT→GGT, Codon 91 TGC→GGC; siehe auch Abb. 3.24). Der Austausch der beiden Cysteine führt zur Zerstörung der Cys-X-X-Cys Zink-Finger-Motive in E7, welche für die Dimerisierung von E7 von Bedeutung sind, wodurch im Vergleich zum Wildtyp-E7 ein instabileres Protein mit deutlich reduzierter Transformationsfähigkeit entsteht²⁹¹.

Auch für L1, das Hauptkapsidprotein, wurden verschiedene Varianten verwendet. Das Gen für HPV-16 L1ΔC (Abb. 3.1 C) codiert ein am C-Terminus um 34 Aminosäuren verkürztes L1-Protein. Diese Deletion beeinflusst nicht die Bildung von L1 VLPs und damit auch nicht die Induktion neutralisierender L1-spezifischer Antikörper²⁸². Allerdings wird durch die Deletion das interne Kernlokalisierungssignal von L1 entfernt, wodurch das L1ΔC-Protein im Gegensatz zum Gesamt-L1-Protein nicht in den Zellkern transportiert wird, sondern im Zytoplasma verbleibt. Die Lokalisation im Zytoplasma könnte sich nachteilig auf die effiziente Bildung von VLPs auswirken²⁹².

Zur Generierung der Gene für die L1/E7-Fusionsproteine mit natürlicher HPV-16 *codon usage* diente das L1ΔC-Gen (Abb. 3.1 C), indem im Falle von L1/E7₁₋₆₀ (Abb. 3.1 D) die codierende DNA für die ersten 60 Aminosäuren von HPV-16 E7 an den C-Terminus von L1ΔC kloniert wurden²⁸². Durch diese Fusion bleibt die Fähigkeit von L1 zur Bildung von VLPs erhalten. Die VLPs aus L1 und E7 werden auch als chimäre VLPs (cVLP) bezeichnet. Durch cVLPs können einerseits neutralisierende L1-spezifische Antikörper und andererseits E7-spezifische Immunantworten induziert werden, so daß cVLPs sowohl als prophylaktische als auch als therapeutische Vakzine eingesetzt werden können^{282,287}. Für das L1/E7mut-Gen (Abb. 3.1 E) wurde die DNA codierend für die gesamten 98 Aminosäuren von E7mut an den C-Terminus von L1ΔC kloniert. Das L1/E7mut-Fusionsprotein bildet keine VLPs, jedoch werden die Kapsomer-Untereinheiten der VLPs gebildet, die auch zur Induktion einer neutralisierenden Antikörperantwort führen (persönl. Mitteilung von M. Müller, DKFZ, Heidelberg). Durch die fehlende Zusammenlagerung in VLPs ist die induzierte humorale Immunantwort im Vergleich zu L1/E7₁₋₆₀ deutlich reduziert. Aber dafür sind im Gegensatz zu L1/E7₁₋₆₀ noch alle potentiellen E7-spezifischen T-Zellepitope im L1/E7mut-Fusionsprotein enthalten (siehe Abb. 3.24).

Wegen der schlechten Expression der HPV-16 L1-Gene mit natürlicher *codon usage* (siehe Abb. 3.8) wurden zusätzliche Varianten für L1 verwendet. Aufgrund der engen Kopplung des Lebenszyklus der Papillomaviren mit der Differenzierung der infizierten Epithelzellen (siehe 1.1.1) ist die effiziente Expression der HPV *late* Gene (L1 und L2) in undifferenzierten Zellen sehr fragwürdig. Daher wurden in dieser Arbeit neben den beschriebenen Genen mit der natürlichen HPV-16 *codon usage* auch HPV-16 L1-Gene mit einer *codon usage* verwendet, die für die Expression in der Pflanze *Solanum tuberosum* (L1p) optimiert wurden²⁹² (Abb. 3.1 B). In dem Gen für L1p wurden 51.5% aller Codons modifiziert, ohne die Proteinsequenz gegenüber der natürlichen *codon usage* zu verändern²⁹². Von M. Müller (DKFZ, Heidelberg) wurden zwei Plasmide für HPV-16 L1p bzw. dem Fusionsprotein L1p/E7₁₋₆₀ (Abb. 3.1 D) für die Generierung adenoviraler Konstrukte zur Verfügung gestellt. Ausgehend von diesen beiden Genen wurden die Gene für L1pΔC und L1p/E7mut (Abb. 3.1 C, D), wie später beschrieben, generiert. So standen für die Konstruktion der adenoviralen Vektoren mit HPV-16 Sequenzen auch die Gene für L1pΔC, L1 p/E7₁₋₆₀ und L1p/E7mut zur Verfügung. Für die Konstruktion eines adenoviralen Vektors, der das gesamte L1-Protein codiert, stand nur L1p mit der *Solanum tuberosum* optimierten *codon usage* zur Verfügung.

3.1.2 Konstruktion von adenoviralen Cosmiden mit HPV-16 Sequenzen

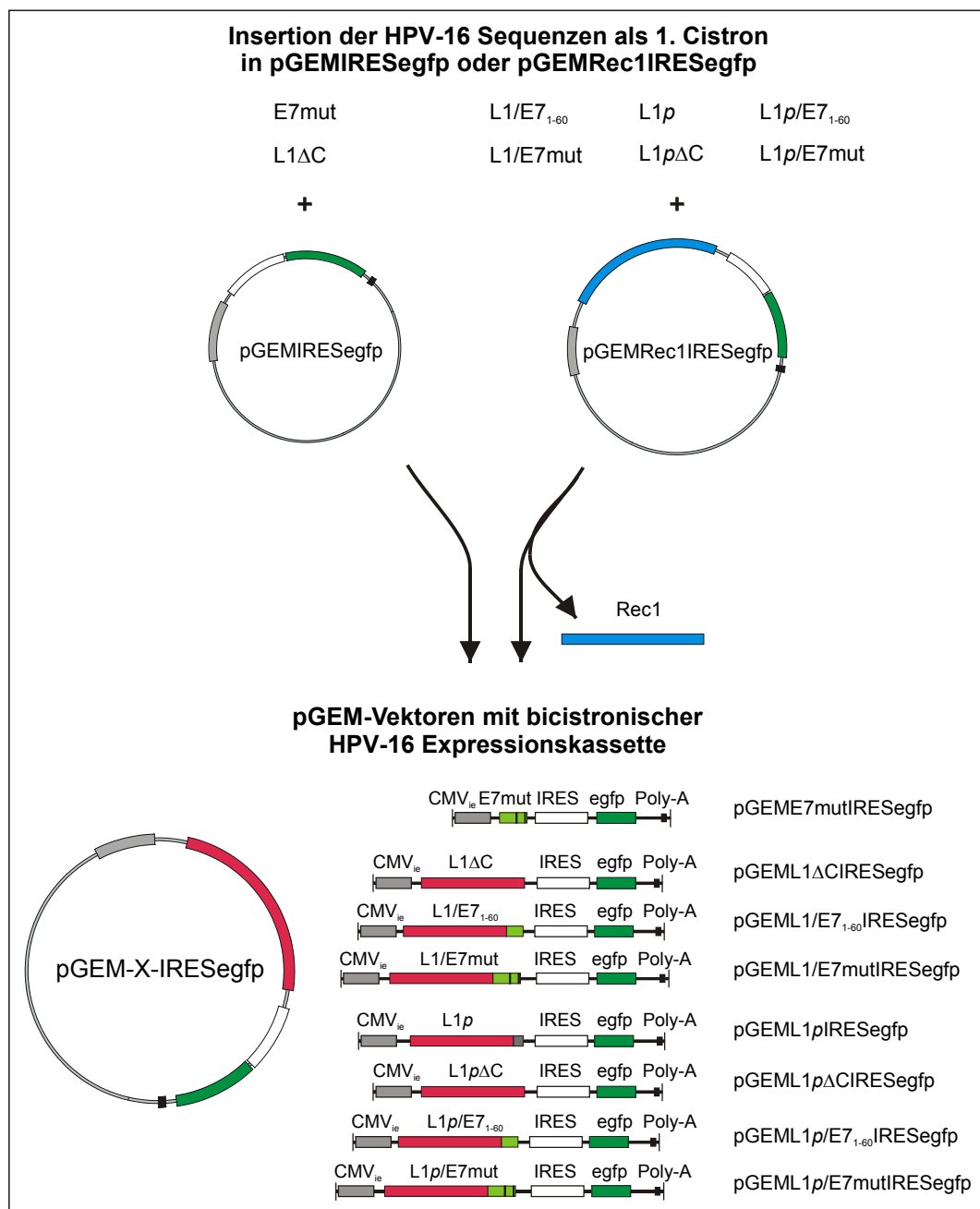


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Konstruktion der bicistronischen Expressionskassetten mit HPV-16 Sequenzen als erstem Cistron. Für die Klonierung der Expressionskassetten wurde das jeweilige HPV-16 Gen entweder in pGEMIRESegfp inseriert oder gegen das Rec-1-Gen in pGEMRec1IRESegfp ausgetauscht. Eine detailliertere Beschreibung der Klonierungsstrategien ist in den Kapiteln der jeweiligen Konstrukte und in Tab. 3.1 zu finden.

Für die Herstellung der rekombinanten Adenoviren wurde das in der Arbeitsgruppe Lindenmaier/Dittmar entwickelte System, das auf der Verwendung eines adenoviralen Cosmidvektors beruht, verwendet. Die Verwendung von adenoviralen Cosmidvektoren, die wie Plasmide repliziert und *in vitro* in Lambda-Bacteriophagenpartikel verpackt werden, ermöglicht im Gegensatz zu den anderen Systemen, die auf der homologen Rekombination beruhen, den Vorteil, daß die Transduktion durch Lambda-Partikel, welche die effizienteste Transfermethode von DNA dieser Größe in *E. coli* darstellt, genutzt werden kann. Durch die einfache *in vitro* Manipulation des adenoviralen Genoms durch

konventionelle Klonierungsmethoden wurde das Problem der geringen Effizienz der homologen Rekombination mit diesem System gelöst. Ein weiterer Vorteil des adenoviralen Cosmidsystems gegenüber den auf der homologen Rekombination basierenden Systemen ist, daß durch die Transfektion der 293 Produktionszellen mit einem definierten adenoviralen Cosmidvektor, der bereits die Expressionskassette enthält, keine Kontamination mit nicht-rekombinanten Adenoviren erfolgt, die eine zeitintensive und über mehrere Passagen andauernde Aufreinigung der rekombinanten Adenoviren erforderlich machen würde. Dies konnte durch die Verwendung bicistronischer Expressionskassetten mit dem Reportergen egfp (*enhanced green fluorescence protein*) als zweitem Cistron anhand der Kolo-kalisation der EGFP-Expression und Virusbildung sehr elegant gezeigt werden (Abb. 3.4 B und Abb. 3.12 B).

Die Generierung der adenoviralen Cosmidvektoren erfolgte in einem Zwei-Stufen-Prozeß. Im ersten Schritt wurden die Expressionskassetten mit den jeweiligen HPV-16 Sequenzen kloniert (Abb. 3.2). Im zweiten Schritt wurden die Expressionskassetten in den adenoviralen Cosmidvektor inseriert (Abb. 3.3).

Zur Herstellung der Expressionskassetten mit HPV-16 Sequenzen (Abb. 3.2):

Die Gene der jeweiligen HPV-16 Proteine bzw. Fusionsproteine (Abb. 3.1) wurden als erstes Cistron in die bicistronische Expressionskassette der Plasmide pGEMIRESegfp oder pGEMRec1IRESegfp kloniert, wobei das relevante Gen entweder als erstes Cistron inseriert wurde oder das Rec1-Gen ersetzte. In diesen bicistronischen Expressionskassetten wird die Transkription durch den CMV-Promotor reguliert. Durch die Verwendung eines IRES-Elementes (*internal ribosome entry site*), das aus dem Poliovirus stammt, wird die gleichzeitige Expression mehrerer Gene von einem Transkript ermöglicht. Als zweites Cistron wurde das Gen für EGFP eingesetzt, das als Reportergen für die Produktion rekombinanter Adenoviren in 293 Zellen sowie für die Infektion mit rekombinanten Adenoviren diente. Die Expression von EGFP diente aber auch zur Kontrolle der Funktionalität der Expressionskassetten.

Zur Insertion der Expressionskassetten in den adenoviralen Cosmidvektor (Abb. 3.3):

Die Insertion der bicistronischen Expressionskassetten mit den HPV-16 Genen in die deletierte E1-Region erfolgte durch Insertion in den adenoviralen Vektor pAdcos45 bzw. durch den Ersatz der Expressionskassette in pAdcos45Rec1IRESegfp. Nach der *in vitro* Verpackung der adenoviralen Cosmidvektoren in Lambda-Phagenpartikel erfolgte die effiziente Transduktion in *E. coli*. Für die Transduktion in *E. coli* DH5 α wurden Raten von $\sim 10^5$ Transduktanten pro μg pcos44-DNA erzielt. Die Analyse der Klone zeigte, daß generell mehr als 90 % der analysierten Klone das korrekte Insert enthielten, da die Größe der pAdcos45-Vektoren ohne inserierte Expressionskassette von etwa 36 kb unterhalb der für eine effiziente Verpackung in Lambda-Bacteriophagen notwendigen Größe von 38 kb liegt. Die Struktur der Cosmid-DNA der jeweiligen Konstrukte wurde mit Restriktionsenzymen verifiziert (3.1.4.1). Für die Herstellung der replikationsdefizienten Adenoviren wurde die aufgereinigte und durch Restriktionsenzyme charakterisierte adenovirale Cosmid-DNA in 293 Zellen mittels Calciumphosphat-Kopräzipitation transfiziert (siehe 3.1.3).

Die detaillierte Konstruktion der adenoviralen Cosmidvektoren mit HPV-16 Sequenzen wird in den folgenden Kapiteln beschrieben und ist in Tab. 3.1 zusammengefaßt.

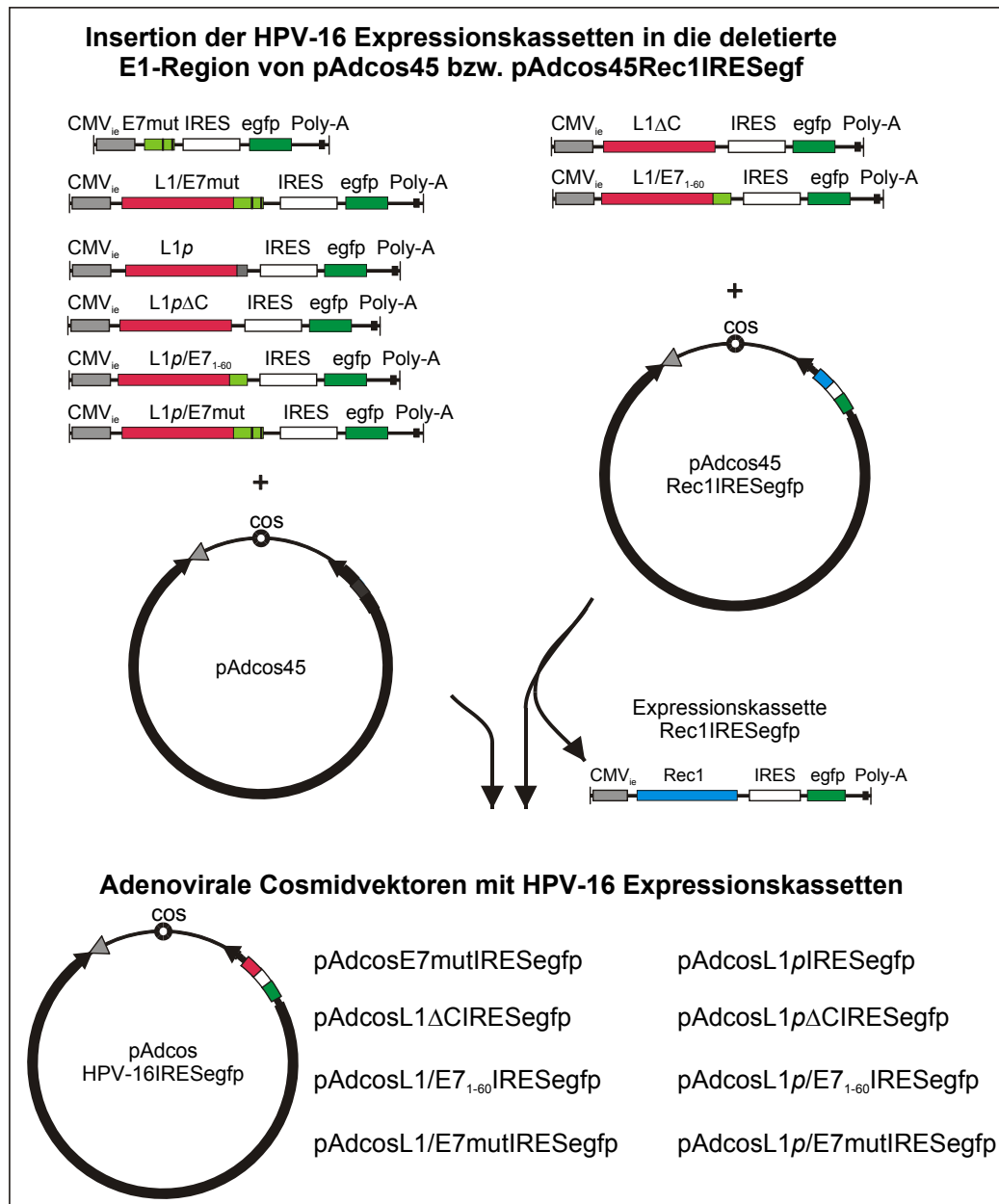


Abb. 3.3: Schematische Übersicht der Insertion der HPV-16 Expressionskassetten in die deletierte E1-Region des adenoviralen Cosmidvektors. Die Insertion der bicistronischen Expressionskassetten erfolgte entweder durch Insertion in pAdcos45 oder Austausch mit der Expressionskassette von pAdcos45Rec1IRESegfp. Eine detailliertere Beschreibung der Klonierungsstrategien ist in den Kapiteln der jeweiligen Konstrukte und in Tab. 3.1 zu finden.

3.1.2.1 Klonierung von pAdcosE7mutIRESegfp

Aus dem Plasmid pCMV-E7mut (Gissmann, DKFZ, Heidelberg) wurde mittels PCR der für HPV-16 E7mut codierende DNA-Bereich amplifiziert. Für diese PCR wurden die Oligonukleotid-Primer (siehe Tab. 2.1) zuvor phosphoryliert, so daß das 331 bp große PCR-Produkt direkt für die Insertion in pGEMIRESegfp verwendet werden konnte. Für diese Insertion wurde pGEMIRESegfp zuvor mit SmaI gespalten und mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die bicistronische Expressionskassette besteht aus CMV-Promotor, HPV-16 E7mut als erstem Cistron, IRES-Element und egfp als zweitem Cistron.

Durch DNA-Sequenzierung wurden die Sequenz von HPV-16 E7mut und die Orientierung *in sense* des inserierten PCR-Produktes verifiziert. Die korrekten Klone mit der beschriebenen Mutation der Codons 58 und 91 (siehe 3.1.1) wurden als pGEME7mutIRESegfp bezeichnet. Die bicistronische Expressionseinheit wurde mit Psp1406I und XbaI ausgeschnitten und das 2898 bp große Fragment in den adenoviralen Cosmidvektor pAdcos45 kloniert. Für die Insertion der Expressionskassette wurde pAdcos45 zuvor mit ClaI und XbaI gespalten und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Nach *in vitro* Verpackung in Lambda-Phagenkapside, Transduktion in *E. coli* und Charakterisierung der Klone durch Restriktionsanalysen wurde der entstandene Vektor als pAdcosE7mutIRESegfp bezeichnet.

3.1.2.2 Klonierung von pAdcosL1ΔCIRESegfp

Die DNA für HPV-16 L1ΔC mit der Wildtyp-Sequenz wurde in Form des Plasmids pCEP4-L1ΔC von L. Gissmann (DKFZ, Heidelberg) bereitgestellt. L1ΔC wurde mit XbaI und XhoI aus pCEP4-L1ΔC ausgeschnitten und das 1408 bp große Fragment in pGEMRec1IRESegfp kloniert. Dafür wurde pGEMRec1IRESegfp zuvor mit SalI und NheI gespalten, so daß das Rec1-Gen aus der bicistronischen Expressionskassette ausgeschnitten und durch das L1ΔC-Fragment ersetzt werden konnte. Die Insertion des L1ΔC-Fragmentes erfolgte aufgrund der kompatiblen kohäsiven DNA-Enden in *sense* Orientierung. Die bicistronische Expressionskassette von pGEML1ΔCIRESegfp bestehend aus CMV-Promotor, HPV-16 L1ΔC als erstem Cistron, IRES-Element und egfp. Die Expressionskassette wurde mit SwaI und XbaI ausgeschnitten und das 4208 bp große Fragment wurde in SwaI/XbaI geschnittenen pAdcos45Rec1IRESegfp kloniert, dessen bicistronische Expressionskassette durch die neue Expressionskassette ersetzt wurde. Die Struktur von pAdcosL1ΔCIRESegfp wurde durch Restriktionsanalysen kontrolliert.

3.1.2.3 Klonierung von pAdcosL1/E7₁₋₆₀IRESegfp

Die für HPV-16 L1/E7₁₋₆₀ codierende DNA wurde aus pCEP4-L1/E7₁₋₆₀ (L. Gissmann, DKFZ, Heidelberg) mit XbaI und XhoI ausgeschnitten. Das 1666 bp große Fragment wurde anschließend durch Austausch mit Rec1 in pGEMRec1IRESegfp (SalI/NheI) kloniert. Das resultierende Plasmid wurde als pGEML1/E7₁₋₆₀IRESegfp bezeichnet. Für die Insertion dieser Expressionskassette in einen adenoviralen Cosmidvektor wurde die bicistronische Expressionskassette von pAdcos45Rec1IRESegfp mit SwaI und XbaI ausgeschnitten und durch die 4394bp große Expressionskassette aus pGEML1/E7₁₋₆₀IRESegfp (SwaI/XbaI) ersetzt. Durch Restriktionskartierung wurde die Struktur von pAdcosL1/E7₁₋₆₀IRESegfp kontrolliert.

3.1.2.4 Klonierung von pAdcosL1/E7mutIRESegfp

Die DNA für HPV-16 L1/E7mut wurde durch XbaI und HpaI aus pVL1393-L1/E7mut (L. Gissmann, DKFZ, Heidelberg) freigesetzt und das 1942 bp große Fragment anschließend durch Austausch mit Rec1 in pGEMRec1IRESegfp (SalI/NheI) kloniert. Der entstandene Vektor wurde pGEML1/E7mutIRESegfp bezeichnet. Die bicistronische Expressionskassette von pGEML1/E7mutIRESegfp wurde mit Psp1406I und XbaI ausgeschnitten. Durch Insertion in den mit XbaI/ClaI behandelten und dephosphorylierten pAdcos45 wurde die 4673 bp große Expressionskassette in den adenoviralen Cosmidvektor

kloniert. Der entstandene Vektor wurde nach Kontrolle der Struktur als pAdcosL1/E7mutIRESegfp bezeichnet.

3.1.2.5 Klonierung der adenoviralen Cosmidvektoren mit Pflanzen-Codon optimierter L1-Sequenz

pAdcosL1pIRESegfp:

Aus pBS-II-HPV-16L1p (M. Müller, DKFZ, Heidelberg) wurde die DNA codierend für L1p mit XbaI und XhoI ausgeschnitten. Das 1548 bp große Fragment wurde an die Stelle des Rec1-Gens in die Expressionskassette von pGEMRec1IRESegfp kloniert. Die Exzision des Gens für Rec1 erfolgte durch Spaltung von pGEMRec1IRESegfp mit SalI und NheI. Die Insertion von L1p erfolgte durch die kompatiblen kohäsiven DNA-Enden in *sense* Orientierung. Aus pGEML1pIRESegfp wurde die bicistronische Expressionskassette (Psp1406I/XbaI, 4276 bp) mit CMV-Promotor, HPV-16L1p als erstem Cistron, IRES-Element und dem zweitem Cistron egfp in den mit ClaI/XbaI und CIP behandelten pAdcos45 kloniert. Der entstandene adenovirale Cosmidvektor wurde als pAdcosL1pIRESegfp bezeichnet.

pAdcosL1pΔCIRESegfp:

Die DNA für L1pΔC (1436 bp) wurde durch PCR aus pBS-II-HPV-16L1p (M. Müller, DKFZ, Heidelberg) amplifiziert. Die Oligonukleotid-Primer (siehe Tab. 2.1) wurden nach Müller et al.²⁸² entwickelt und führen an der Deletionsstelle eine EcoRV-Restriktionsstelle ein, die dazu führt, daß die letzten beiden Codons die nicht HPV-16 Aminosäuren Asparaginsäure und Isoleucin statt Asparagin und Glycin codieren. Diese Modifikation zu dem L1ΔC-Gen mit der natürlichen HPV *codon usage* wurden gewählt, da durch diese Veränderung die Bildung der VLPs effizienter erfolgt²⁸². Das 1436 bp große PCR-Produkt wurde in pGEMIRESegfp (SmaI, CIP) kloniert. Die Sequenz von L1pΔC und Insertion in *sense* Orientierung wurde durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Die bicistronische Expressionskassette (4003 bp) wurde mit Psp1406I und XbaI aus pGEML1pΔCIRESegfp ausgeschnitten und anschließend in pAdcos45 (ClaI/XbaI, CIP) kloniert. Durch Restriktionskartierung wurde die Struktur von pAdcosL1pΔCIRESegfp kontrolliert.

pAdcosL1p/E7₁₋₆₀IRESegfp:

Das Gen für L1p/E7₁₋₆₀ wurde aus pBS-II-HPV-16L1p/E7₁₋₆₀ (M. Müller, DKFZ, Heidelberg) mit XbaI und XhoI ausgeschnitten und das 1740 bp große Fragment anschließend durch Austausch mit Rec1 in pGEMRec1IRESegfp (SalI/NheI) kloniert. Die bicistronische Expressionskassette von pGEML1p/E7₁₋₆₀IRESegfp wurde mit Psp1406I und XbaI ausgeschnitten. Durch Insertion in den mit XbaI/ClaI behandelten und dephosphorylierten pAdcos45 wurde die Expressionskassette (4468 bp) in den adenoviralen Cosmidvektor kloniert und als pAdcosL1p/E7₁₋₆₀IRESegfp bezeichnet.

Tab. 3.1: Zusammenfassung der Klonierung der rekombinanten Adenoviren mit HPV-16 Sequenzen.

HPV-16 Sequenz	Herkunft	Klonierung	Expressionskassetten-Vektor	Expressionskassetten-Plasmid	Adenocosmidvektor	rekomb. Adenocosmidvektor	rekomb. Virus
E7mut	pCMV-E7mut	PCR (331 bp)	pGEMIRESegfp, SmaI, CIP (5608 bp)	pGEME7mutIRESegfp, Psp1406I/XbaI (2898 bp)	pAdcos45, ClaI/XbaI, CIP (36008 bp)	pAdcosE7mut IRESegfp (38906 bp)	AdE7 (32714 bp)
L1ΔC	pCEP4- L1ΔC	XbaI/XhoI (1408 bp)	pGEMRec1IRESegfp, SalI/NheI, CIP (5769 bp)	pGEML1ΔCIRESegfp, SwaI/XbaI (4208 bp)	pAdcos45Rec1IRESegfp, SwaI/XbaI (36016 bp)	pAdcosL1ΔC IRESegfp (40216 bp)	AdL1ΔC (34024 bp)
L1/E7 ₁₋₆₀	pCEP4-L1/E7 ₁₋₆₀	XbaI/XhoI (1666 bp)	pGEMRec1IRESegfp, SalI/NheI, CIP (5769 bp)	pGEML1/E7 ₁₋₆₀ IRESegfp, SwaI/XbaI (4394 bp)	pAdcos45Rec1IRESegfp, SwaI/XbaI (36016 bp)	pAdcosL1/E7 ₁₋₆₀ IRESegfp (40396 bp)	AdL1/E7 ₁₋₆₀ (34204 bp)
L1/E7mut	pVL1393- L1/E7mut	XbaI/HpaI (1942 bp)	pGEMRec1IRESegfp, SmaI/NheI, CIP (5772 bp)	pGEML1/E7mutIRESegfp, Psp1406I/XbaI (4673 bp)	pAdcos45, ClaI/XbaI, CIP (36008 bp)	pAdcosL1/E7mut IRESegfp (40784 bp)	AdL1/E7mut (34592 bp)
L1p	pBS-II-HPV-16 L1p	XbaI/XhoI (1548 bp)	pGEMRec1IRESegfp, SalI/NheI, CIP (5769 bp)	pGEML1pIRESegfp, Psp1406I/XbaI (4276 bp)	pAdcos45, ClaI/XbaI, CIP (36008 bp)	pAdcosL1p IRESegfp (40284 bp)	AdL1p (34092bp)
L1pΔC	pBS-II-HPV-16 L1p	PCR (1436 bp)	pGEMIRESegfp, SmaI, CIP (5608 bp)	pGEML1pΔCIRESegfp, Psp1406I/XbaI (4003 bp)	pAdcos45, ClaI/XbaI, CIP (36008 bp)	pAdcosL1pΔC IRESegfp (40011 bp)	AdL1pΔC (33819 bp)
L1p/E7 ₁₋₆₀	pBS-II-HPV-16L1p/E7 ₁₋₆₀	XbaI/XhoI (1740 bp)	pGEMRec1IRESegfp, SalI/NheI, CIP (5769 bp)	pGEML1p/E7 ₁₋₆₀ IRESegfp, Psp1406I/XbaI (4468 bp)	pAdcos45, ClaI/XbaI, CIP (36008 bp)	pAdcosL1p/E7 ₁₋₆₀ IRESegfp (40476 bp)	AdL1p/E7 ₁₋₆₀ (34284 bp)
L1p/E7mut	pGEML1p/E7 ₁₋₆₀ IRESegfp	SfiI/NsiI (2275 bp)	pGEML1/E7mutIRESegfp, SfiI/NsiI (5508 bp)	pGEML1p/E7mutIRESegfp, Psp1406I/XbaI (4742 bp)	pAdcos45, ClaI/XbaI, CIP (36008 bp)	pAdcosL1p/E7mut IRESegfp (40750 bp)	AdL1p/E7mut (34558 bp)

pAdcosL1p/E7mutIRESegfp:

Das Gen für L1p/E7mut wurde durch Spaltung von pGEML1p/E7₁₋₆₀IRESegfp mit NsiI und SfiI (2275 bp großes Fragment mit L1pΔC und CMV-Promotor) und anschließende Insertion des 2275 bp Fragmentes in den mit NsiI/SfiI behandelten pGEML1/E7mutIRES egfp kloniert. Das Plasmid mit dem entstandenen Fusionsprotein L1p/E7mut wurde als pGEML1p/E7mutIRESegfp bezeichnet. Durch Insertion in den mit XbaI/ClaI behandelten und dephosphorylierten pAdcos45 wurde die 4742 bp große Expressionskassette in den adenovirale Cosmidvektor kloniert. Der entstandene Vektor wurde nach Kontrolle der Struktur als pAdcosL1p/E7mutIRESegfp bezeichnet.

3.1.3 Herstellung und Aufreinigung replikationsdefizienter Adenoviren mit HPV-16 Sequenzen

Für die Herstellung rekombinanter Adenoviren wurde die aufgereinigte und charakterisierte adenovirale Cosmid-DNA in 293 Zellen transfiziert (Abb. 3.4 A). 293 Zellen stellen die Genprodukte der deletierten E1-Region *in trans* zur Verfügung und ermöglichen daher die für die Virusbildung und Produktion der replikationsdefizienten Adenoviren notwendige virale DNA-Replikation²⁴⁷. Da das adenovirale Genom als Cosmidvektor in zirkulärer Form transfiziert wurde, verzögert sich der Beginn der adenoviralen DNA-Replikation. So ist gezeigt, daß die ersten viralen Plaques nach Transfektion des adenoviralen Genoms in zirkulärer Form eines Cosmidvektors im Gegensatz zu der Transfektion linearer adenoviraler DNA, wo bereits ab Tag 5 Plaques nachweisbar sind²³³, nicht vor Tag 10-14 gebildet werden³⁰⁰.

Nach der Transfektion wurden von allen Konstrukten primäre Adenovirusstocks hergestellt (3.1.3.1) und die Struktur der viralen DNAs (3.1.4.1) sowie die Funktionalität (3.1.4.2, 3.1.4.3) der hergestellten Adenoviren charakterisiert.

Die primären Adenovirusstocks und auch Stocks nachfolgender Infektionen sind für die Infektion von dendritischen Zellen nicht geeignet, da die viralen Titer wegen der Aufarbeitung als *freeze-thaw-lysate* vergleichsweise niedrig sind, und sie außerdem mit Zellbestandteilen aus dem Zellaufschluß kontaminiert sind. Deshalb wurden für die Infektion der dendritischen Zellen von den rekombinanten Adenoviren CsCl-gereinigte Stocks mit hohen Titern hergestellt, die abschließend noch dialysiert wurden (3.1.3.2). Die Dialyse wurde durchgeführt, um CsCl und möglicherweise für dendritische Zellen toxische Substanzen (z.B. Rückstände des Detergenz) aus den Adenovirusstocks zu entfernen.

3.1.3.1 Herstellung primärer Adenovirusstocks

Die Herstellung der replikationsdefizienten rekombinanten Adenoviren in 293 Zellen ist unter anderem von der Passage der Zellen abhängig. Aus diesem Grund wurden für die Transfektionen 293 Zellen einer frühen Passage (bis Passage 40) verwendet, 293LP (*low passage*). Die Transfektion der 293LP Zellen mittels Calciumphosphat-Kopräzipitation erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 20 µg Cosmid-DNA bei Erreichen eines Konfluenzgrades von 70-80 %. Alle 4-5 Tage wurde ein Medienwechsel durchgeführt und ab Tag 9 nach der Transfektion wurde die Bildung von Plaques im Zellmonolayer mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die IRES-abhängige Expression von EGFP ermöglichte die einfache fluoreszenzmikroskopische Überprüfung der Transfektionseffizienz anhand

der EGFP-Fluoreszenz. Standardmäßig wurde diese fluoreszenzmikroskopische Abschätzung am Tag 3 nach der Transfektion durchgeführt, wobei abhängig von dem physiologischen Zustand der 293LP Zellen und der Qualität des Calciumphosphat-DNA-Kopräzipitates zwischen 10-30 % der Zellen EGFP-positiv waren. Es zeigte sich, daß abhängig von der Art des ersten Cistrons die IRES-abhängige Expression variiert (Abb. 3.4 B). Die EGFP-Fluoreszenz war nach Transfektion mit pAdcosE7mutIRESegfp, dem Konstrukt mit dem kleinsten HPV-Gen, am intensivsten und am schwächsten nach Transfektion mit pAdcosL1p/E7mutIRESegfp. Weiterhin fiel auf, daß die EGFP-Fluoreszenz nach Transfektion der Cosmid-DNA der Konstrukte, die L1-Sequenzen mit der natürlichen HPV-16 *codon usage* enthalten, im Vergleich zu den L1p-Konstrukten deutlich schwächer bzw. nicht detektierbar war. Es ist bekannt, daß die IRES-abhängige Expression durch die Anwesenheit schlecht exprimierbarer Sequenzen im ersten Cistron negativ beeinflusst wird (persönl. Mitteilung H. Hauser, GBF, Braunschweig). Die Ergebnisse des Western Blots (Abb. 3.8) zeigen, daß die reduzierte EGFP-Fluoreszenz nach Transfektion der Cosmid-DNA bereits ein indirekter Hinweis auf die jeweilige Expressionsstärke der unterschiedlichen L1-Konstrukte war.

Durch die Verwendung bicistronischer Expressionskassetten mit dem Reportergen *egfp* als zweitem Cistron konnte anhand der Kolokalisation der EGFP-Fluoreszenz mit den adenoviralen Plaques (Abb. 3.4 B) gezeigt werden, daß die inserierte Expressionskassette vorhanden und funktionell war. Die Expression des Reportergens bestätigte ferner, daß bei der Transfektion eines definierten adenoviralen Cosmidvektors, der bereits die Expressionskassette enthält, die Aufreinigung der rekombinanten Viren von nicht-rekombinanten Viren, wie es bei der homologen Rekombination erforderlich ist, nicht durchgeführt werden mußte.

Für die adenoviralen Konstrukte mit HPV-16 Sequenzen wurden die ersten adenoviralen Plaques am Tag 9 nach der Transfektion von pAdcosE7mutIRESegfp bzw. zwischen Tag 12 und 14 für die anderen Konstrukte detektiert (Abb. 3.4 B). Nach der Detektion der ersten Plaques mit virusproduzierenden EGFP-positiven Zellen, die zytopathische Effekte aufwiesen, zeigten die meisten Zellen innerhalb der nächsten 2 bis 4 Tage ebenfalls die Expression des Reportergens und zytopathische Effekte. Die rekombinanten Viren wurden geerntet und primäre Adenovirusstocks hergestellt. Auch die mit den Konstrukten transfizierten Zellen, welche die Wildtyp-L1-Sequenzen enthielten, wurden geerntet, obwohl die EGFP-Expression nicht bzw. nur sehr schwach detektierbar war (Abb. 3.4), so daß von allen adenoviralen Cosmiden, die HPV-16 Protein oder Fusionsproteine codieren, rekombinante Adenoviren gebildet wurden, und primäre Adenovirusstocks hergestellt wurden.

Die Benennung der Viren erfolgte basierend auf dem ersten Cistron des jeweiligen Konstruktes (AdE7, AdL1ΔC, AdL1/E7₁₋₆₀, AdL1/E7, AdL1p, AdL1pΔC, AdL1p/E7₁₋₆₀, AdL1p/E7).

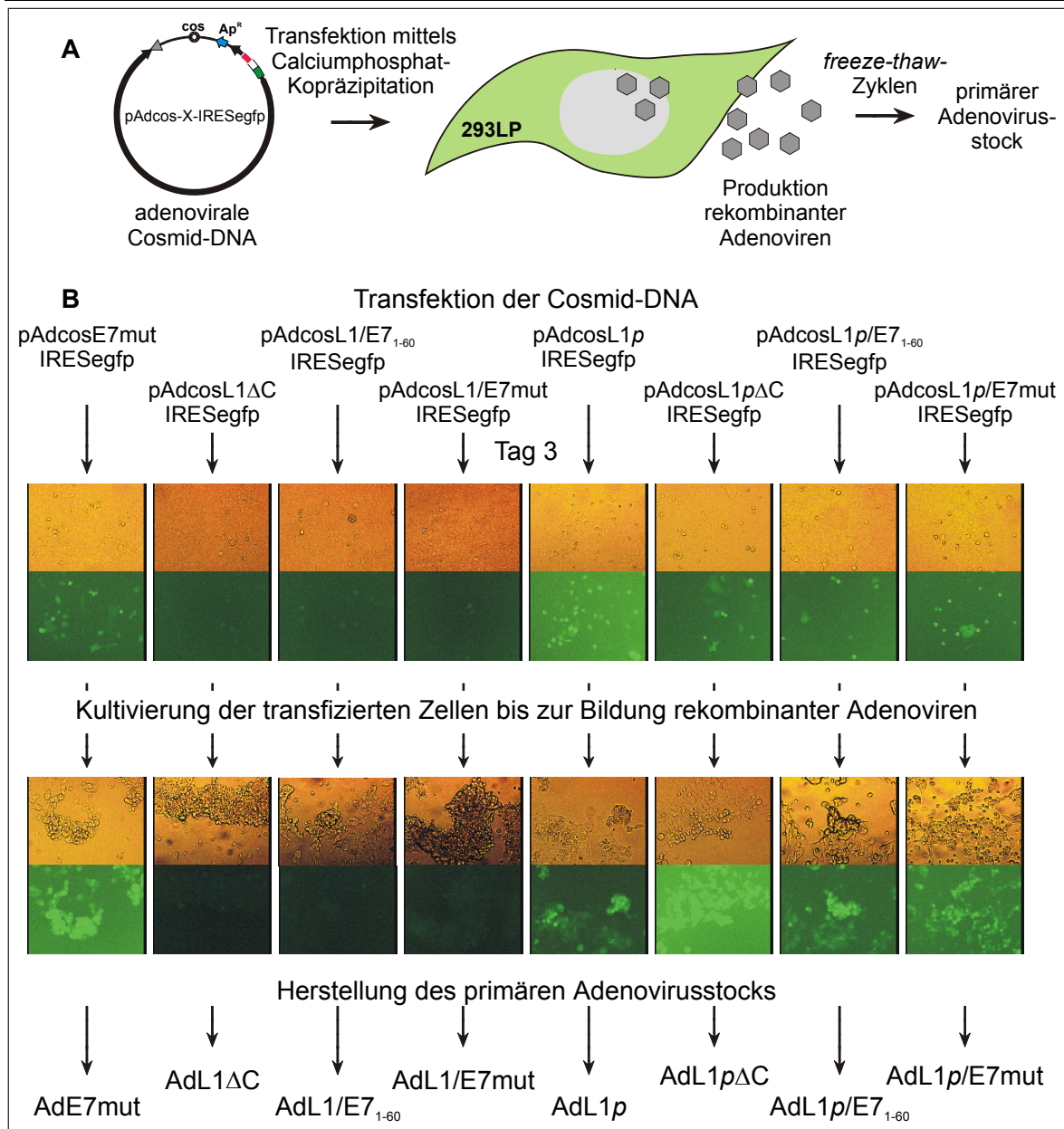


Abb. 3.4: Herstellung replikationsdefizienter rekombinanter Adenoviren mit HPV-16 Sequenzen nach Transfektion der adenoviralen Cosmid-DNA in 293LP. (A) Schematischer Ablauf der Generierung der primären Adenovirusstocks. (B) 20 µg Cosmid-DNA des jeweiligen HPV-16 Konstruktes wurden in 293LP transfiziert. Am Tag 3 wurde die Transfektionseffizienz anhand der EGFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch bestimmt und bis zur Bildung adenoviraler Plaques weiter verfolgt. Die ersten Plaques wurden zwischen 9-14 Tagen nach der Transfektion detektiert. Die Benennung der Viren erfolgte nach dem ersten Cistron. Aufnahmen mit 100-facher Vergrößerung.

3.1.3.2 Herstellung dialysierter CsCl-gereinigter Adenovirusstocks

Die Herstellung hochtitriger Stocks der rekombinanten Adenoviren mit HPV-16 Sequenzen erfolgte für die Infektion dendritischer Zellen, da sie im Gegensatz zu den primären Adenovirusstocks frei von kontaminierenden Zellbestandteilen vom Zellaufschluß durch die *freeze-thaw*-Zyklen sind, welche möglicherweise die Funktion der dendritischen Zellen beeinflussen könnten. Zuerst wurden 293LP-Zellen bis Passage 38 in 16 Zellkulturflaschen (175 cm²) mit Verdünnungen des jeweiligen Adenovirusstocks infiziert und geerntet, wenn alle Zellen zytopathische Effekte zeigten. Nach drei

Waschschritten mit 0,1 M Tris/HCl-Lösung konnte auf diese Weise ein großer Teil der Viren, die überwiegend Zell-assoziiert vorlagen, in ein kleines Volumen aufkonzentriert werden. Die Freisetzung der Zell-assoziierten Viren erfolgte durch Inkubation mit Na-Desoxycholat und anschließender Degradation der genomischen Zell-DNA durch Inkubation mit Benzonase. Die Aufreinigung der Adenoviruspartikel aus diesem Roh-Lysat wurde über zwei aufeinanderfolgende CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugationen durchgeführt, so daß die korrekten Adenoviruspartikel von defekten und leeren Viruspartikel sowie Zelltrümmern abgetrennt wurden.

Nach der Aufreinigung der Adenoviruspartikel wurden die Adenovirusstocks dreimal gegen den Dialysepuffer (10 mM HEPES, 500 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 1 mM KCl, pH 7,8) dialysiert. Anschließend wurde der Virustiter durch Infektion von 293LP Zellen und Bestimmung der Plaque bildenden Einheiten ermittelt. Die dialysierten CsCl-gereinigten Adenovirusstocks wiesen Titer zwischen 2×10^{10} und 5×10^{10} PFU/ml auf. Die Ausbeute pro 16 Zellkulturflaschen (175 cm²) war unabhängig vom verwendeten Konstrukt und betrug zwischen 1×10^{10} und $2,5 \times 10^{10}$ PFU.

3.1.4 Charakterisierung der adenoviralen HPV-16 Konstrukte und Nachweis der Transgen-Expression

Um die Identität und Struktur der rekombinanten Adenoviren mit HPV-16 Vektoren zu kontrollieren, wurde die adenovirale DNA durch Restriktionskartierung analysiert. Die Funktionalität der adenoviralen Vektoren und die Expression der Transgene wurden durch immunozytochemische Färbungen und durch Western Blot nachgewiesen. Neben den mit Adenovirus infizierten Zellen dienten Mock infizierte Zellen, die identisch behandelt wurden, aber nicht mit Adenovirus infiziert wurden („Scheininfection“), als Kontrolle.

3.1.4.1 Präparation und Charakterisierung der adenoviralen DNA

Für die Präparation der DNA aus infizierten Zellen wurden 293LP Zellen mit den jeweiligen adenoviralen HPV-16 Konstrukten infiziert und weiterkultiviert bis deutlich zytopathische Effekte sichtbar waren. Nach Lyse und proteolytischer Behandlung der infizierten Zellen mit Pronase wurden die chromosomale und adenovirale DNA des hochviskösen Lysates durch Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt, resuspendiert und durch Restriktionskartierung charakterisiert. Das Restriktionsmuster der adenoviralen DNA wurde mit dem der adenoviralen Cosmid-DNA verglichen. Durch den Doppelverdau der isolierten Adenovirus-DNAs mit SmaI und XbaI wurde überprüft, ob die hergestellten Vektoren die inserierte Expressionskassette enthielten (Abb. 3.5 B). Um die Struktur des adenoviralen Genoms weiter zu analysieren, wurden die Adenovirus-DNAs auch mit HindIII und EcoRV gespalten (nicht gezeigt).

Das Restriktionsmuster der zirkulären Adenocosmid-DNA unterscheidet sich für einzelne DNA-Fragmente von dem der präparierten Adenovirus-DNA (siehe Tab. 3.2), da die zirkuläre Cosmid-DNA im Gegensatz zu der linearen Virus-DNA prokaryontische DNA-Vektorsequenzen enthält, wie u.a. die *cos*-Sequenz aus pHC79 und das Ampicillin-Resistenzgen. Diese prokaryontischen Sequenzen sind in der linearen Adenovirus-DNA nicht enthalten, da die adenovirale DNA-Replikation innerhalb des linken und rechten *inverted terminal repeats* (ITR) erfolgt, so daß die Regionen außerhalb dieser ITRs nicht

repliziert werden. Die Abweichungen in der Größe einiger DNA-Fragmente sind daher charakteristisch für die Adenovirus-DNA. Unter den in Abb. 3.5 B dargestellten elektrophoretischen Bedingungen war der Unterschied (siehe Tab. 3.2) zwischen den 36016 bp Fragmenten der zirkulären Adenocosmid-DNAs und den 29487 bp Fragmenten der linearen Adenovirus-DNAs nicht erkennbar. Auch das kleine 337 bp DNA-Fragment (linkes ITR bis SmaI-Restriktionsschnittstelle) war unter diesen Bedingungen nicht erkennbar. Bei dem DNA-Schmier in einigen Adenovirus-DNAs handelt es sich um die chromosomale DNA der infizierten Zellen.

Tab. 3.2: Erwartete Restriktionsmuster der jeweiligen linearen Adenovirus-DNA oder zirkulären Adenocosmid-DNA nach Doppelverdau mit SmaI und XbaI. Die grau unterlegten DNA-Fragmente entsprechen den jeweiligen Expressionskassetten.

DNA	Restriktionsmuster nach Behandlung mit SmaI + XbaI		
AdL1ΔC	29487 bp	4200 bp	337 bp
AdL1/E7 ₁₋₆₀	29487 bp	4380 bp	337 bp
AdL1/E7	29487 bp	4768 bp	337 bp
AdL1pΔC	29487 bp	3995 bp	337 bp
pAdcosL1pΔCIRESegfp	36016 bp	3995 bp	
AdL1p/E7 ₁₋₆₀	29487 bp	4460 bp	337 bp
pAdcosL1p/E7 ₁₋₆₀ IRESegfp	36016 bp	4460 bp	
AdL1p/E7	29487 bp	4734 bp	337 bp
pAdcosL1p/E7mutIRESegfp	36016 bp	4734 bp	
AdE7	29487 bp	2890 bp	337 bp
pAdcosE7mutIRESegfp	36016 bp	2890 bp	
AdL1p	29487 bp	4268 bp	337 bp
Ad45	29314 bp		337 bp

Die Restriktionsmuster der Virus-DNAs der rekombinanten Adenoviren AdE7, AdL1ΔC, AdL1/E7₁₋₆₀, AdL1/E7, AdL1p, AdL1pΔC, AdL1p/E7₁₋₆₀ und AdL1p/E7 stimmten mit den erwarteten DNA-Fragmentgrößen überein.

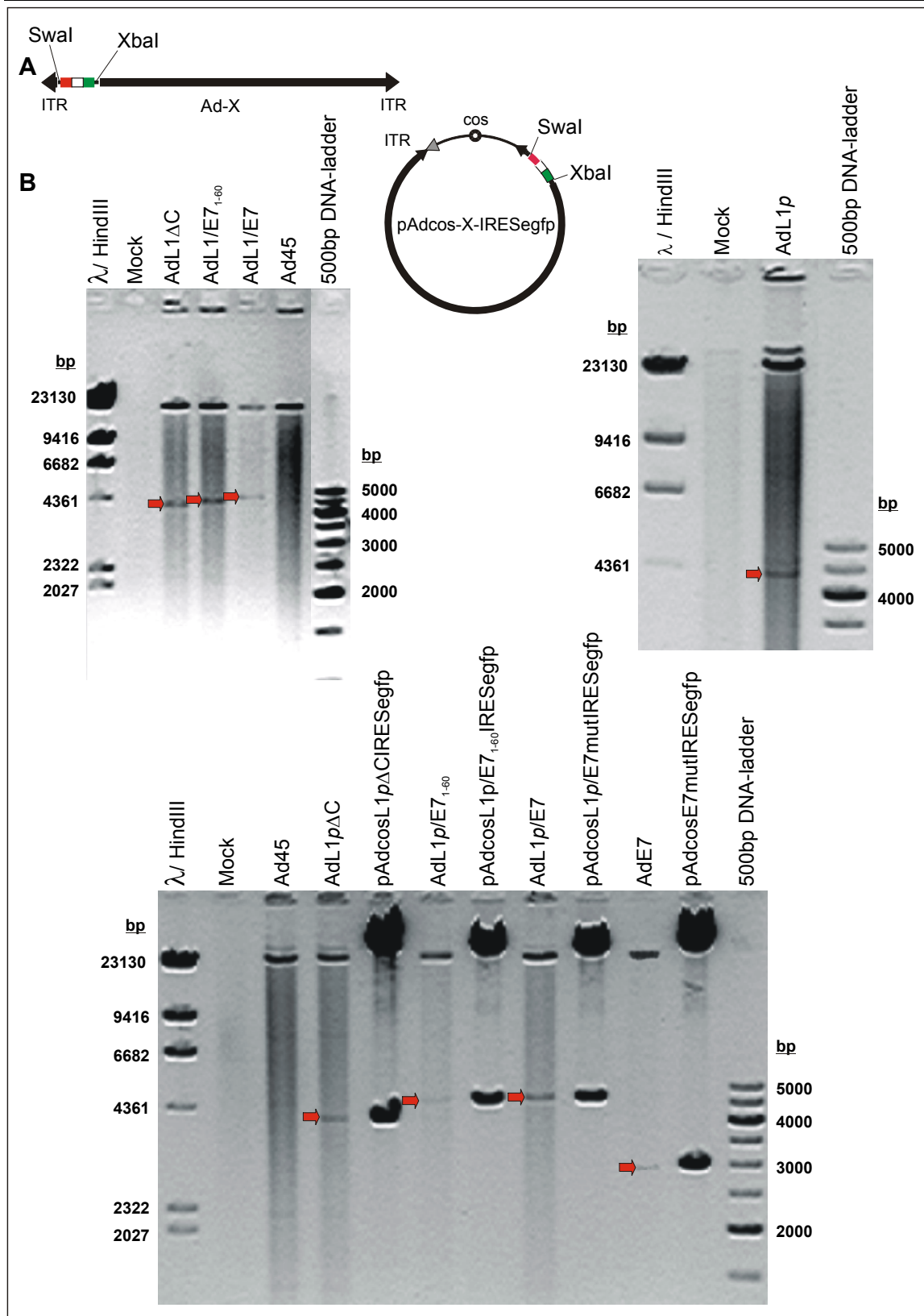


Abb. 3.5: Charakterisierung der adenoviralen DNA der rekombinanten Vektoren mit HPV-16 Sequenzen. (A) Vergleich der linearen Adenovirus-DNA, die nicht mehr die prokaryontischen Sequenzen außerhalb der beiden ITRs enthält, mit der zirkulären Adenocosmid-DNA. (B) Gelelektrophoretische Auftrennung der SwaI/XbaI-Restriktionsansätze von DNAs isoliert aus Zellen infiziert mit den HPV-16 Adenoviren, mit Ad45 oder Mock bzw. der zirkulären Cosmid-DNA einiger HPV-16 Konstrukte. Tab. 3.2 enthält die zu erwartenden Restriktionsmuster. Die 337 bp Fragmente der linearen Virus-DNAs sowie der Unterschied zwischen den 29487 bp Fragmenten der Virus-DNAs und den 36016 bp Fragmenten Adenocosmid-DNAs sind unter den verwendeten Bedingungen nicht nachweisbar.

3.1.4.2 Immunozytochemische Färbungen

Die Expression der HPV-16 Proteine und Fusionsproteine wurde indirekt durch immunozytochemische Färbungen infizierter A549 Zellen nachgewiesen. A549 Zellen sind nicht-permissiv für die Virusbildung und Produktion replikationsdefizienter Adenoviren, da sie im Gegensatz zu 293 Zellen nicht die deletierten E1-Genprodukte, die für die virale DNA-Replikation notwendig sind, zur Verfügung stellen. Aus diesem Grund zeigen A549 Zellen nach der Infektion mit replikationsdefizienten Adenoviren keine zytopathischen Effekte und lösen sich nicht vom Kulturgefäßboden ab, weshalb sie sich für die immunozytochemischen Färbungen besonders eignen.

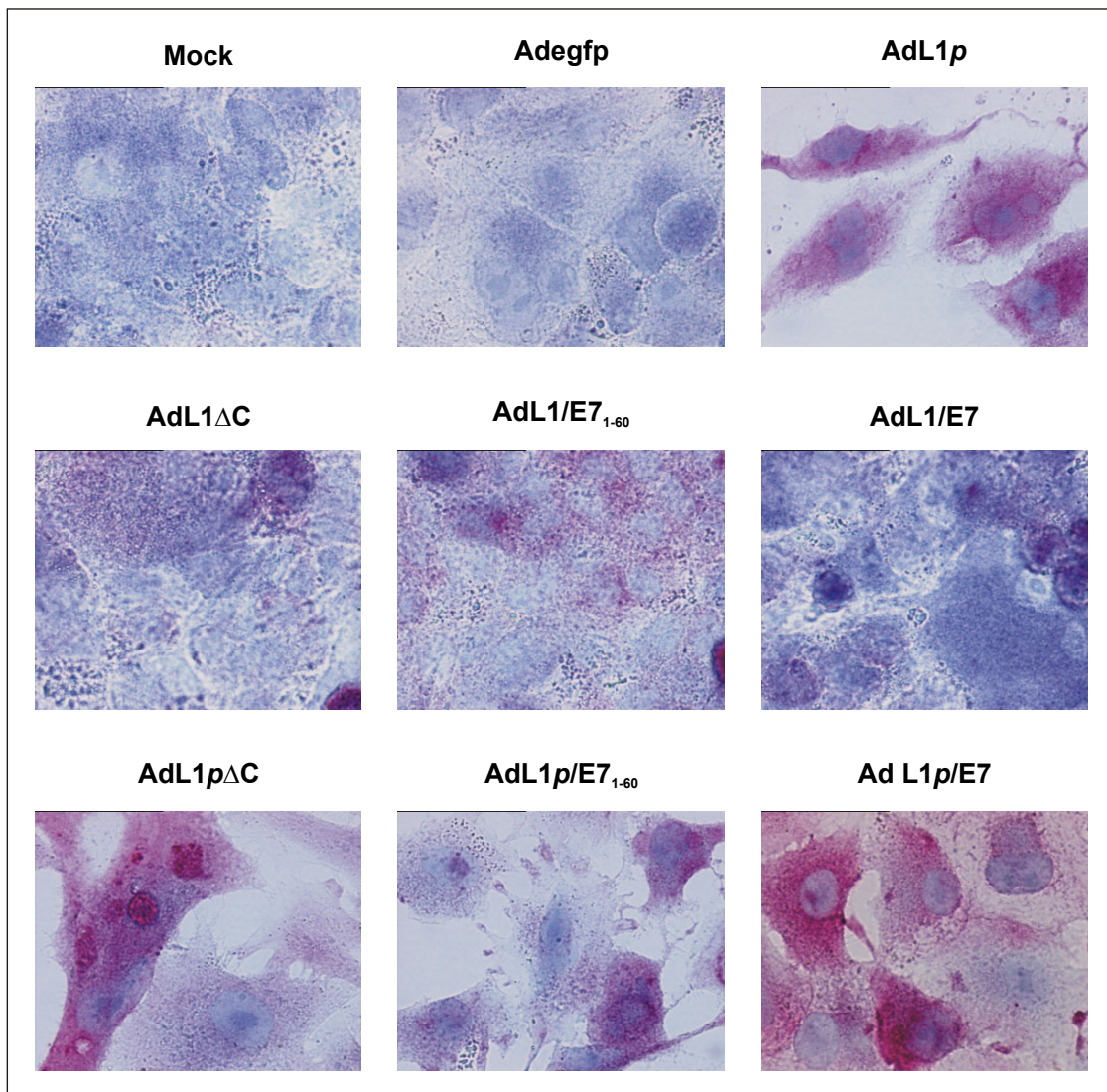


Abb. 3.6: Indirekter Nachweis der Expression der HPV-16 L1-Proteine und L1/E7-Fusionsproteine in infizierten A549 Zellen durch immunozytochemische Färbungen spezifisch für HPV-16 L1. Nach der Infektion der Zellen mit den entsprechenden adenoviralen Konstrukten wurden die Färbungen, wie unter 2.6.4 beschrieben, durchgeführt. Die Expression der L1p-Konstrukte war deutlich höher als für die Konstrukte mit den natürlichen HPV-16 L1-Codons. Vergrößerung 400-fach.

Für die L1- und E7-spezifischen Färbungen wurden A549 Zellen mit Verdünnungen der entsprechenden rekombinanten Adenoviren mit HPV-16 Sequenzen infiziert. Als Kontrollen wurden Mock-Infektionen bzw. Infektionen mit Adegfp (siehe 2.5.1) durchgeführt. Adegfp enthält in der deletierten E1-Region eine monocistronische

Expressions-kassette mit dem egfp-Reportergen unter Kontrolle des CMV-Promotors. Der Verlauf der Infektion wurde durch die EGFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert. Zwei Tagen nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und anschließend mit den primären Antikörpern spezifisch für HPV-16 L1 oder E7 inkubiert. Nach der Behandlung mit dem Biotin-gekoppelten sekundären Antikörper wurde für die Visualisierung der Expression das universelle Immunostainingsystem mit alkalischer Phosphatase-gekoppeltem Streptavidin von Immunotech verwendet. Abschließend wurden die Präparate mikroskopisch betrachtet und dokumentiert.

Die mikroskopische Auswertung der L1-spezifischen Färbungen (Abb. 3.6) zeigten eine eindeutige Expression des Transgens nach Infektion mit den rekombinanten Adenoviren, die L1-Sequenzen mit der für Pflanzenoptimierten *codon usage* (L1p) enthalten. Die Intensität des präzipitierten Substrates dieser Ansätze war deutlich von dem schwachen Hintergrund der Kontrollen zu unterscheiden. Im Vergleich zu den L1p-Konstrukten war die Expression nach Infektion mit den rekombinanten Adenoviren mit den natürlichen HPV-16 L1-Codons deutlich schwächer (siehe auch Abb. 3.8) und die Färbung nur minimal stärker als in den Kontrollen.

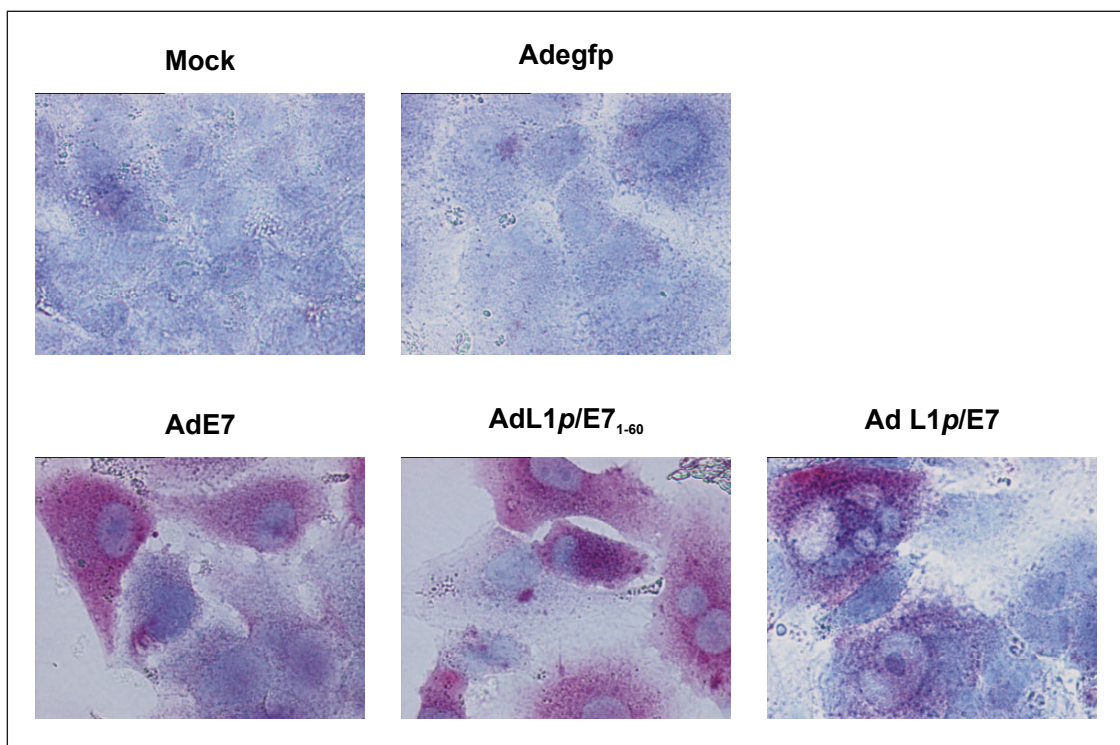


Abb. 3.7: Indirekter HPV-16 E7-spezifischer Nachweis der Expression von E7 und des E7-Teils in den L1p/E7-Fusionsproteinen durch immunozytochemische Färbungen infizierter A549 Zellen. Nach der Infektion der Zellen mit den entsprechenden adenoviralen Konstrukten wurden die Färbungen, wie unter 2.6.4 beschrieben, durchgeführt. Vergrößerung 400-fach.

Der indirekte Nachweis der HPV-16 E7-Expression (Abb. 3.7) war eindeutig positiv in den AdE7-infizierten A549 Zellen. Die Kontrollen wiesen nur eine sehr schwache Färbung auf. Um das Vorhandensein des E7-Teils der L1/E7-Fusionsproteine zu kontrollieren, wurden immunozytochemische Färbungen von A549 Zellen infiziert mit AdL1p/E7₁₋₆₀ bzw. AdL1p/E7 durchgeführt. Die E7-spezifischen Färbungen der Zellen infiziert mit AdL1p/E7₁₋₆₀ oder AdL1p/E7 zeigten den eindeutigen Nachweis von E7 in den Fusionsproteinen.

3.1.4.3 Nachweis der Transgen-Expression durch Western Blot

Neben den immunozytochemischen Färbungen wurde die HPV-16 Transgen-Expression auch durch Western Blot nachgewiesen, um die Größe der exprimierten Proteine zu kontrollieren, und um zusätzlich Information über die Expressionsintensität zu erhalten. Der Western Blot-Nachweis der Expression der HPV-16 Proteine und Fusionsproteine erfolgte in Zellextrakten von 293LP für L1 bzw. A549 Zellen für E7, die mit den jeweiligen rekombinanten Adenoviren infiziert wurden (Abb. 3.8). Als Kontrolle wurden Mock-Infektionen durchgeführt. Anhand der EGFP-Expression wurde der Verlauf der Infektion beobachtet und die Zellen zwei Tage nach Infektion geerntet. Aus den Lysaten wurden gleiche Proteinmengen in einem SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Als weitere Kontrolle wurden VLPs bestehend aus dem HPV-16 L1-Protein verwendet (M. Müller, DKFZ, Heidelberg). Nach den Inkubationen mit dem L1-spezifischen primären und dem PO-gekoppelten sekundären Antikörper erfolgte die Visualisierung der detektierten Proteinbanden mit dem ECL⁺-System (Amersham).

Im HPV-16 L1-spezifischen Western Blot (Abb. 3.8 B) konnte die Expression der L1-Proteine und L1/E7-Fusionsproteine nachgewiesen werden. Im Vergleich zu der Größe der L1-VLPs entsprachen die Proteingrößen der exprimierten L1-Proteine und L1/E7-Fusionsproteine den erwarteten Werten. Wie bereits bei der Auswertung der immunozytochemischen Färbungen spezifisch für L1 (Abb. 3.6) zeigte sich, daß von den L1-Proteinen und L1/E7-Fusionsproteinen mit Pflanzen-Codon optimierter L1-Sequenz (*L1p*) mehr Protein (ca. zehnmal mehr) exprimiert wurde als im Vergleich zu den Konstrukten mit den natürlichen HPV-16 L1-Codons. Die ineffiziente Expression der Konstrukte mit natürlichen HPV-16 L1-Codons ist auf die bekannten Probleme einer effizienten L1-Expression in undifferenzierten Zellen zurückzuführen, die auf der engen Kopplung des Lebenszyklus von HPV mit der Differenzierung der infizierten Epithelzellen beruht. Die Zunahme der L1-Expression mit den *L1p*-Konstrukten stimmt mit den Ergebnissen von Leder et al.²⁹² überein. Somit war die schwache EGFP-Expression nach der Transfektion der Cosmid-DNA der Konstrukte mit der natürlichen HPV-16 L1 *codon usage* (Abb. 3.4) bzw. nach der Infektion mit den entsprechenden rekombinanten Adenoviren bereits ein indirekter Nachweis der unterschiedlichen Expressionsstärke.

Für den indirekten Nachweis der HPV-16 E7-Expression mittels Western Blot wurden A549 Zellen verwendet. Die Aufarbeitung der Lysate von AdE7- bzw. Mock-infizierten A549 erfolgte wie für den indirekten L1-Nachweis. Gleiche Proteinmengen wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert, und nach den Inkubationen mit dem E7-spezifischen primären und dem PO-gekoppelten sekundären Antikörper erfolgte die Visualisierung der detektierten Proteinbande mit dem ECL⁺-System (Amersham). Die Expression von E7 in den AdE7-infizierten Zellen konnte im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 3.8 C). Die Größe des exprimierten E7 entsprach der erwarteten Proteingröße von ca. 12 kDa.

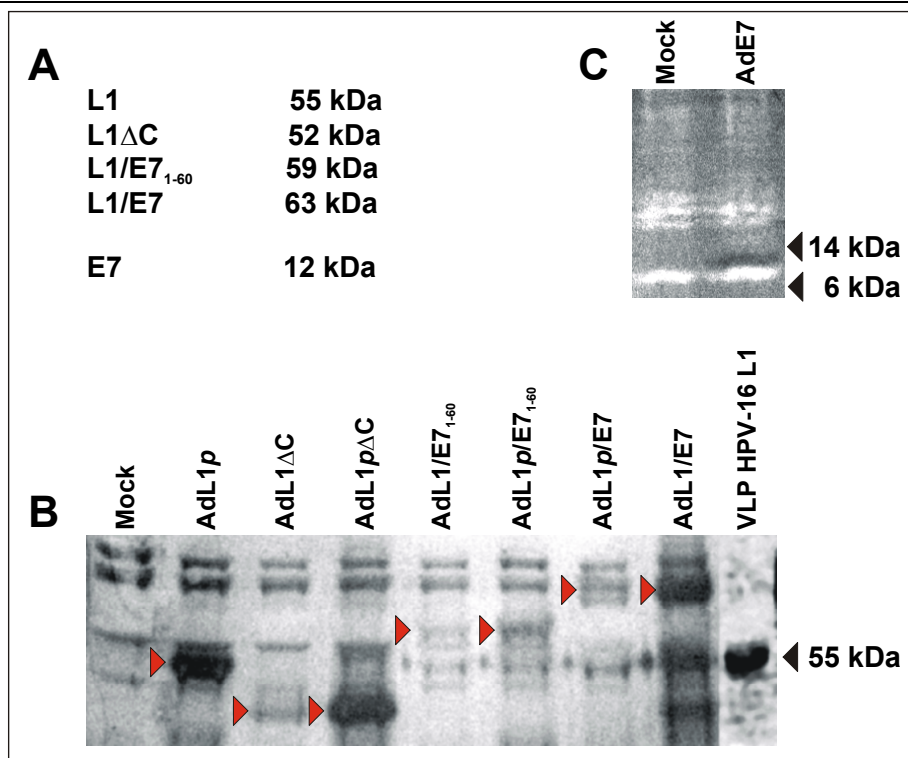


Abb. 3.8: Indirekter Nachweis der HPV-16 Transgen-Expression mittels Western Blot. (A) Erwartete Proteingrößen. (B) HPV-16 L1-Nachweis in infizierten 293 Zellextrakten. Nach Infektion mit den entsprechenden rekombinanten Adenoviren wurden von den Zellsaten etwa gleiche Proteinmengen über ein SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf eine PVDF-Membran gebロットet. Der Nachweis erfolgte wie unter 2.6.3 beschrieben. Die Expression der L1-Konstrukte mit Pflanzen-Codon optimierten L1-Sequenzen (L1p) war deutlich höher als für die Konstrukte mit HPV-16 L1-Codons. (C) Nachweis der HPV-16 E7-Expression in AdE7-infizierten A549 Zellen. Die Auftrennung der Zellextrakte und Visualisierung der Proteinbande erfolgte wie unter 2.6.2 und 2.6.3 beschrieben.

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, daß adenovirale Vektoren, die HPV-16 Proteine oder Fusionsproteine exprimieren, hergestellt werden konnten. Die DNA-Struktur und in die deletierte E1-Region inserierte Expressionskassetten konnten durch die Restriktionskartierung der aus infizierten Zellen präparierten Virus-DNAs bestätigt werden. Der Nachweis der Expression der HPV-16 Sequenzen durch immunozytochemische Färbungen und Western Blot zeigte, daß die L1p-Konstrukte mit den für Pflanzenoptimierten Codons effizienter exprimiert wurden als die entsprechenden Konstrukte mit den natürlichen HPV-16 L1-Codons. Daher wurden für die weiteren Arbeiten zur Infektion von dendritischen Zellen nur die effizienter exprimierten Konstrukte mit L1p-Sequenzen verwendet.

3.2 Herstellung und Charakterisierung rekombinanter Adenoviren mit kostimulatorischen Molekülen

Neben der Herstellung rekombinanter Adenoviren mit HPV-16 Sequenzen war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Generierung rekombinanter Adenoviren codierend für kostimulatorische Moleküle. Die Ergebnisse zur Konstruktion der adenoviralen Vektoren mit HPV-16 Sequenzen haben gezeigt, daß mit dem adenoviralen Cosmidklonierungssystem eine effiziente Technik für die Generierung rekombinanter Adenoviren zur Verfügung stand. Zusätzlich zu dem Transfer von therapeutisch anwendbaren HPV-16 Antigenen in

dendritische Zellen könnte aber auch die Bereitstellung von Genen für immunmodulatorische Moleküle, sog. kostimulatorischer Moleküle, die Initiation einer effektiven Immunantwort verbessern. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Mitgliedern der TNF- bzw. TNFR-Superfamilie mit immunmodulatorischen Eigenschaften entdeckt, die für immuntherapeutische Ansätze von Interesse sind. Bekannte Mitglieder der TNFR-Superfamilie sind z.B. CD40, RANK/TRANCE, FAS und 4-1BB (CD137), deren Liganden (CD40L/CD154 RANKL/TRANCE-R, FasL, 4-1BBL) sind bekannte Vertreter der TNF-Superfamilie. Einige TNF-/TNFR-Paare spielen für die Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen eine große Rolle (siehe 1.4), und die daraus resultierenden Effekte auf die Immunantwort rechtfertigen detailliertere Untersuchungen ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften sowie ihren möglichen therapeutischen Nutzen für die Immuntherapie. So erscheint die Infektion von dendritischen Zellen mit mehreren rekombinanten Adenoviren, die einerseits HPV-assoziierte Antigene und andererseits kostimulatorische Moleküle codieren, vielversprechend, um deren stimulatorisches Potential optimal nutzen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Gene der TNF-/TNFR-Rezeptor/Ligandenpaare CD40/CD40L, RANK/RANKL und 4-1BB/4-1BBL, die eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen spielen und daher von therapeutischem Nutzen sein könnten, isoliert und in eine bicistronische Expressionskassette kloniert werden. Nach der Insertion der Expressionskassetten in dem adenoviralen Cosmidvektor und Produktion der rekombinanten Adenoviren konnte der immunmodulatorische Effekt dieser kostimulatorischen Moleküle auf die stimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen untersucht werden.

3.2.1 Konstruktion von regulierbaren adenoviralen Cosmiden mit kostimulatorischen Molekülen

Das Ziel war es adenovirale Vektoren zu generieren, welche die Gene für die murinen kostimulatorischen Moleküle CD40, CD40L, 4-1BB, 4-1BBL, RANK und RANKL enthalten. Die replikationsdefizienten Adenoviren für RANK und RANKL (AdRANK und AdRANKL) wurden von Boris Haupt während seiner Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Lindenmaier/Dittmar generiert und standen zur Verfügung. Die Klonierung der entsprechenden adenoviralen Cosmidvektoren soll hier nur kurz beschrieben werden (3.2.1.5 und 3.2.1.6). In dieser Diplomarbeit wurde bei der Herstellung von AdRANK beobachtet, daß Wechselwirkungen des exprimierten Transgens nach der Transfektion der Cosmid-DNA mit der adenoviralen Replikation bzw. dem zellulären Metabolismus der 293 Produktionszelle die Herstellung replikationsdefizienter Adenoviren inhibierte. Es zeigte sich, daß die Überexpression von RANK in der Zeitspanne nach der Transfektion bis zur Bildung der ersten rekombinanten Adenovirspartikel ein rasches Absterben der transfizierten Zellen zur Folge hatte, weshalb die Bildung rekombinanter Adenoviren ausblieb. Die Ursache für die Inhibition der Virusbildung bei gleichzeitiger RANK Expression ist unklar. Durch die Etablierung eines regulierten adenoviralen Cosmidsystems, in dem die Expression des Transgens in dem genannten Zeitraum reprimiert wurde, konnte dieses Problem gelöst werden. Dies läßt vermuten, daß die Inhibition der Virusbildung auf einen zytotoxischen Effekt der Überexpression von RANK in der 293 Produktionszelle zurückzuführen war. In den regulierbaren adenoviralen Cosmidvektoren wurde zur Repression des Transgens das von Invitrogen angebotene T-REX™-System adaptiert. In

diesem Tetracyclin-abhängigen Regulationssystem wurden die Tetracyclin-Operatorsequenzen (tetO) exakt 10 bp stromabwärts von dem letzten Nukleotid des TATA-Elements innerhalb des humanen CMV-Promotors eingefügt (CMV-TO). Dadurch bindet der Tetracyclin-Repressor (Tet-R) in Abwesenheit von Tetracyclin an die tetO und blockiert so die für die Initiation der Transkription notwendige Bindung der Transkriptionsfaktoren an die TATA-Box. Durch die Verwendung des CMV-TO-Promotors für die Konstruktion der Expressionseinheiten ließ sich dieses System sehr einfach für die Etablierung eines regulierbaren adenoviralen Cosmidklonierungssystem adaptieren, indem durch Kotransfektion der Cosmid-DNA mit einem Tet-R codierenden Plasmid die Expression des Transgens reprimiert wird. Bei einer späteren Anwendung der rekombinanten Adenoviren, die in Abwesenheit des Tet-R erfolgte, zeigte sich, daß keine zusätzliche Induktion erforderlich war, und die Expressionsstärke des CMV-TO-Promotors durch die Modifikation unbeeinflußt blieb.

Die Erfahrungen aus der Herstellung der rekombinanten Adenoviren für die kostimulatorischen Moleküle RANK und RANKL führten zu der Entscheidung, für CD40, CD40L, 4-1BB und 4-1BBL ebenfalls regulierbare Konstrukte herzustellen, um mögliche biologische Effekte ihrer Überexpression mit der adenoviralen DNA-Replikation bzw. dem zellulären Metabolismus der 293 Produktionszelllinie zu verhindern. Die Entscheidung regulierbare Adenocosmidvektoren zu generieren, beruhte primär auf produktionstechnischen Aspekten mit dem Ziel lediglich die Repression für den Zeitraum zwischen Transfektion und erster Virusbildung aufrechtzuerhalten. Für die spätere Anwendung der entsprechenden rekombinanten Adenoviren, wie z.B. für die Infektion von dendritischen Zellen, sollte die Expression der kostimulatorischen Moleküle allerdings nicht reguliert werden, und keine weitere Induktion benötigen.

Für die Klonierung der regulierbaren adenoviralen Cosmidvektoren mußten zunächst die codierenden DNAs für CD40, CD40L, 4-1BB und 4-1BBL (Abb. 3.11) isoliert werden. Da diese Mitglieder der TNF- und TNFR-Superfamilien in aktivierten T-Lymphozyten bzw. professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) exprimiert werden (siehe 1.4), wurde eine weibliche C57Bl/6-Maus zur Aktivierung der Immunsystems mit Freund'schem Adjuvants immunisiert und 4 Tage später die Milz isoliert. Nach der Präparation der Lymphozyten wurde deren Gesamt-RNA isoliert und für die Erststrang cDNA-Synthese mit Oligo-(dT)-Primer verwendet. Anhand der GenBank-Sequenz für CD40, CD40L, 4-1BB und 4-1BBL wurden spezifischen Oligonukleotid-Primer (siehe Tab. 2.1) entwickelt, so daß die relevanten Gene aus der hergestellten cDNA durch PCR isoliert werden konnten. Für die weitere Klonierung wurde den 5'-Primern eine NheI- bzw. eine XhoI-Restriktionsschnittstelle den 3'-Primer angefügt. Die PCRs wurden mit der Platinum Pfx-DNA-Polymerase durchgeführt, die eine *proof reading*-Funktion besitzt und *blunt end*-Fragment produziert.

Um auch sehr geringe Mengen an PCR-Produkten zu klonieren, wurden die PCR-Produkte unter Verwendung des Zero-Blunt-TOPO-PCR-Klonierungssystems (Invitrogen) in den TOPO-Vektor pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen) kloniert. Die Klone wurden zuerst durch Restriktionskartierungen charakterisiert, bevor die Sequenz der inserierten PCR-Produkte durch DNA-Sequenzierung verifiziert wurde. Für die Konstruktion der Vektors mit

regulierbarer bicistronischer Expressionskassette wurden die Klone mit korrekter Sequenz für CD40, CD40L, 4-1BB oder 4-1BBL verwendet.

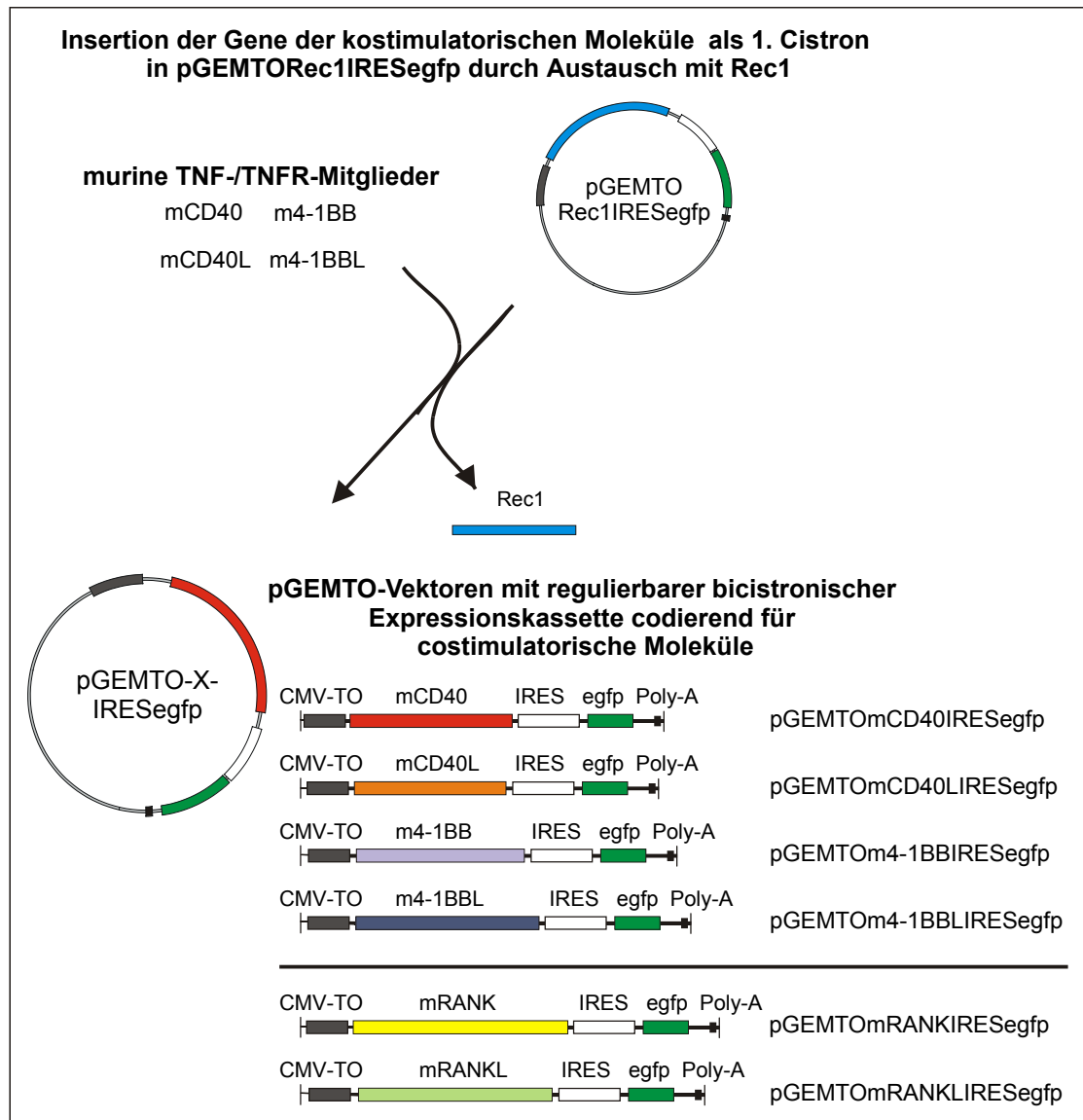


Abb. 3.9: Schematische Darstellung der Konstruktion der durch den CMV-TO-Promotor regulierbaren Expressionskassetten codierend für die murinen (m) kostimulatorischen Moleküle CD40, CD40L, RANK, RANKL, 4-1BB oder 4-1BBL. Für die Klonierung der bicistronischen Plasmide wurde das jeweilige Gen gegen das Gen für Rec1 in pGEMTORec1IRESegfp ausgetauscht. Die beiden Plasmide pGEMTOmRANKIRESegfp und pGEMTOmRANKLIRESegfp wurden zur Verfügung gestellt. Eine detailliertere Beschreibung der Klonierungsstrategien ist in den Kapiteln der jeweiligen Konstrukte und in Tab. 3.3 zu finden.

Die Generierung der regulierbaren adenoviralen Cosmidvektoren erfolgte wie zuvor (3.1.2) in einem Zwei-Stufen-Prozeß mit der Konstruktion der Expressionskassetten als erstem Schritt (Abb. 3.9) und ihrer Insertion in den adenoviralen Cosmidvektor als zweitem Schritt (Abb. 3.10).

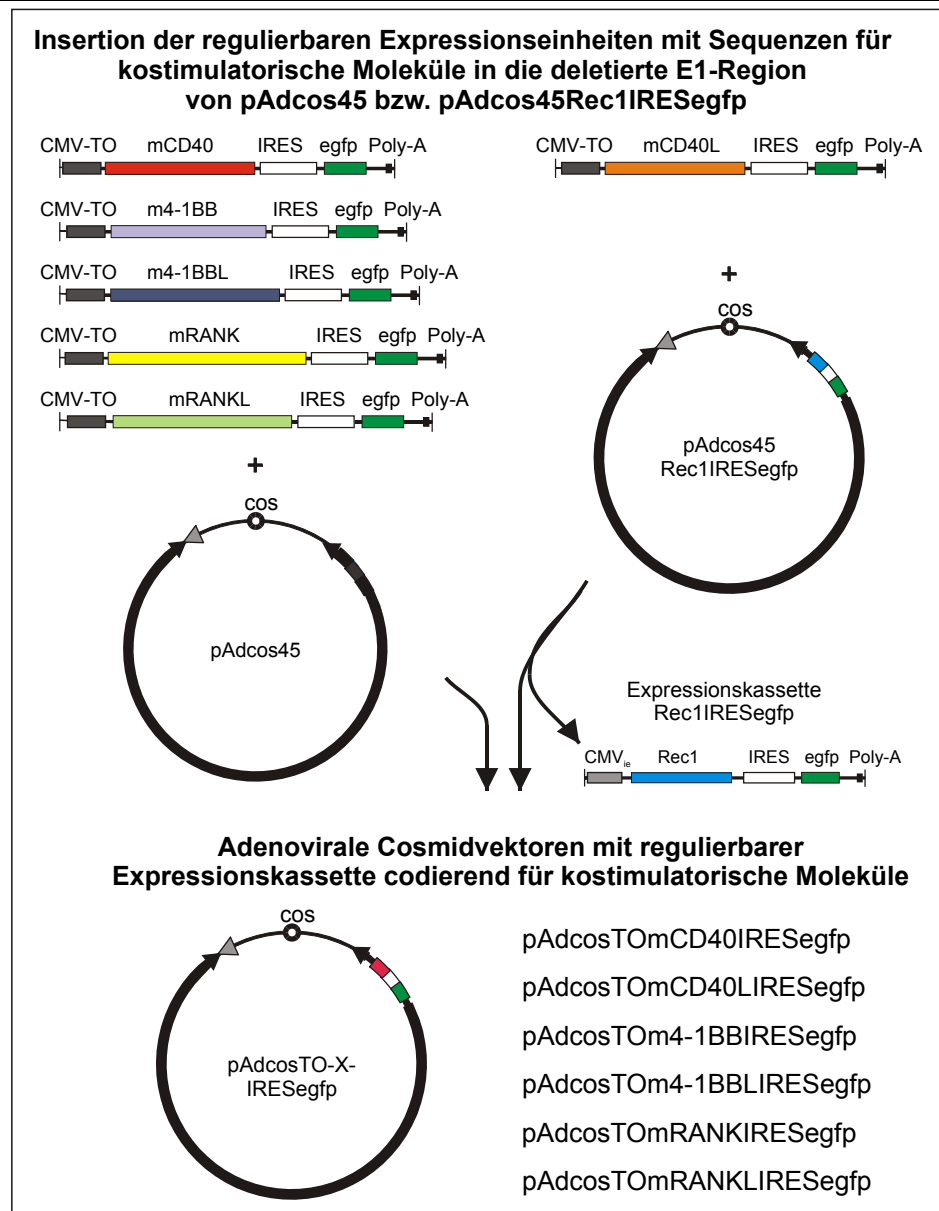


Abb. 3.10: Schematische Darstellung der Insertion der regulierbaren Expressionskassetten mit Genen für kostimulatorische Moleküle in die deletierte E1-Region des adenoviralen Cosmidvektors. Die Insertion der bicistronischen Expressionskassetten mit dem CMV-TO-Promotor erfolgte entweder durch Insertion in pAdcos45 oder Austausch mit der Expressionskassette von pAdcos45Rec1IRESegfp. Eine detailliertere Beschreibung der Klonierungsstrategien ist in den Kapiteln der jeweiligen Konstrukte und in Tab. 3.3 zu finden.

Für die Herstellung regulierbarer bicistronischer Vektoren wurde der CMV-TO-Promotor aus pcDNA4TomyhisA (Invitrogen) mit SnaBI und AflII ausgeschnitten und durch Austausch des entsprechenden DNA-Fragmentes in pGEMRec1IRESegfp (SnaBI/AflII) kloniert. Das resultierende Plasmid wurde als pGEMTORec1IRESegfp bezeichnet und besaß die bicistronische Expressionskassette von pGEMRec1IRESegfp mit einem CMV-TO-Promotor. Die jeweiligen DNAs der kostimulatorischen Moleküle wurden als erstes Cistron in die regulierbare bicistronische Expressionskassette von pGEMTORec1IRESegfp kloniert, indem das Rec1-Gen ausgeschnitten und durch die DNA des kostimulatorischen Moleküls ersetzt wurde (Abb. 3.9). Die Vektoren mit den regulierbaren Expressionseinheiten, in denen die Transkription der kostimulatorischen Moleküle durch den modifizierten CMV-Promotor aus dem T-REXTM-System reguliert wurde, besaßen

zusätzlich ein aus dem Poliovirus stammendes IRES-Element gefolgt von dem egfp-Reportergen als zweitem Cistron, dessen Translation IRES-abhängig erfolgt. Die Expression des Reportergens diente erneut als Kontrolle für die Funktionalität der Expressionskassetten und für die Produktion rekombinanter Adenoviren, aber auch zur Kontrolle der Repression bei der Kotransfektion mit dem Tet-R codierenden Plasmid.

Die Insertion der regulierbaren Expressionseinheiten in die deletierte E1-Region erfolgte wieder durch Insertion pAdcos45 bzw. durch den Ersatz der Expressionskassette in pAdcos45Rec1IRESegfp (Abb. 3.10). Nach der *in vitro* Verpackung der adenoviralen Cosmidvektoren in Lambda-Kapside und Transduktion in *E. coli* wurden die Klone durch Restriktionskartierungen charakterisiert, so daß die korrekten Adenocosmid-DNAs für die Transfektionen in die 293 Produktionszelllinie zur Verfügung standen. Für die Herstellung der rekombinanten Adenoviren wurden Cosmid-DNAs entweder alleine oder mit dem Tet-R codierenden Plasmid pcDNA6/Tet-R (Invitrogen) in die bisher verwendeten 293LP Zellen kotransfiziert (Abb. 3.12 A).

Eine detailliertere Beschreibung sowie Zusammenfassung der Klonierungsstrategien findet sich in den folgenden Kapitel bzw. in Tab. 3.3.

3.2.1.1 Klonierung von pAdcosTOmCD40IRESegfp

Anhand des GenBank-Eintrages M83312 für das murine CD40 (mCD40) wurden die Oligonukleotid-Primer mit NheI- bzw. XhoI-Restriktionsstelle konstruiert (siehe Tab. 2.1) und die entsprechende DNA durch PCR Lymphozyten-cDNA isoliert. Das 930 bp große PCR-Produkt wurde mit dem TOPO-Klonierungssystem (Invitrogen) in pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen) kloniert. Nach der Restriktionsanalyse wurden die Klone als pCR-II-mCD40 bezeichnet und die Sequenz der mCD40-DNA durch DNA-Sequenzierung kontrolliert. Der Sequenzvergleich mit dem GenBank-Eintrag M83319 zeigte, daß alle pCR-II-mCD40-Klone im Codon 255 für Threonin eine stille Mutation (ACA→ACG) und eine Aminosäuresubstitution (AS-Substitution: Met→Ile) im Codon 227 (ATG→ATC) aufwiesen (Abb. 3.11). Diese Modifikation von mCD40 im Codon 227 ist bereits beschrieben (GenBank: XM_110400), so daß es sich nicht um ein PCR-Artefakt handelte. Ob der Austausch der neutralen Aminosäure Met mit schwach polarer Seitenkette gegen eine neutrale Aminosäure mit etwas hydrophoberer Seitenkette einen Einfluß auf die Struktur bzw. Funktion des Proteins hat, konnte nicht anhand der Literatur beantwortet werden.

Die DNA für mCD40 wurde mit NheI und XhoI aus pCR-II-mCD40 ausgeschnitten, die kohäsiven DNA-Enden des 924 bp Fragments mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und in pGEMTORec1IRESegfp kloniert. Dafür wurde zuvor das Rec1-Gen aus pGEMTORec1IRESegfp mit SmaI und NheI entfernt, die kohäsiven DNA-Enden der NheI-Schnittstelle mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und dephosphoryliert, so daß die mCD40-DNA inseriert werden konnte. Die *sense* Orientierung des inserierten Fragmentes wurde durch Restriktionsanalysen überprüft und die korrekten Klone mit der regulierbaren bicistronischen Expressionskassette aus CMV-TO-Promotor, mCD40 als erstem Cistron, IRES-Element und egfp als zweitem Cistron als pGEMTOmCD40IRESegfp bezeichnet. Die Expressionskassette wurde mit Psp1406I und XbaI ausgeschnitten und das 3524 bp Fragment in die deletierte E1-Region von pAdcos45 kloniert. Für die Insertion der

Expressionskassette wurde pAdcos45 zuvor mit ClaI und XbaI gespalten und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Nach *in vitro* Verpackung in Lambda-Phagenkapside, Transduktion in *E. coli* und Charakterisierung der Klone durch Restriktionsanalysen wurde der Vektor als pAdcosTOmCD40IRESegfp bezeichnet.

3.2.1.2 Klonierung von pAdcosTOmCD40LIRESegfp

Die für das murine CD40L (mCD40L) spezifischen Oligonukleotid-Primer mit NheI- und XhoI-Schnittstelle (siehe Tab. 2.1) wurden basierend auf dem GenBank-Eintrag X65453 konstruiert, die DNA für mCD40L durch PCR aus der Lymphozyten-cDNA isoliert und das 811 bp DNA-Fragment in pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen) kloniert. Nach der Restriktionscharakterisierung der Klone, die als pCR-II-mCD40L bezeichnet wurden, wurde von korrekten Klonen die Sequenz von mCD40L durch DNA-Sequenzierung ermittelt. Der Vergleich mit dem GenBank-Eintrag X65453 zeigte, daß in allen pCR-II-mCD40L-Klonen eine AS-Substitution (Ile→Ser) im Codon 198 (ATT→AGT) vorlag (Abb. 3.11). Diese Mutation findet sich auch in GenBank (Eintrag: S21738) und hat keinen Einfluß auf die Funktion des CD40L-Proteins³⁰¹.

Das Fragment für mCD40L wurde mit NheI und XhoI aus pCR-II-mCD40L ausgeschnitten und die kohäsiven DNA-Enden mit T4-DNA-Polymerase zu *blunt end*-Enden aufgefüllt. Das 798 bp Fragment wurde durch Austausch mit RecI in pGEMTORec1IRESegfp (Sall/NheI, T4-DNA-Polymerase, CIP) kloniert und die Insertion in *sense* Orientierung kontrolliert. Aus dem entstandenen pGEMTOmCD40LIRESegfp wurde die Expressionskassette mit SwaI und XbaI ausgeschnitten und das 3390 bp in SwaI/XbaI geschnittenen pAdcos45Rec1IRESegfp kloniert, dessen bicistronische Expressionskassette durch die neue Expressionskassette ersetzt wurde. Die Struktur von pAdcosTOmCD40LIRESegfp wurde durch Restriktionsanalysen kontrolliert.

3.2.1.3 Klonierung von pAdcosTOm4-1BBIRESegfp

Die DNA codierend für das murine 4-1BB (m4-1BB) wurde durch PCR aus der Lymphozyten-cDNA isoliert. Die verwendeten Oligonukleotid-Primer (NheI/XhoI-Restriktionsstellen) spezifisch für m4-1BB wurden anhand des GenBank-Eintrages J04492 entwickelt (siehe Tab. 2.1). Das PCR-Produkt (893 bp) wurde in pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen) kloniert und die Struktur von pCR-II-m4-1BB durch Restriktionsanalyse kontrolliert. Von einigen korrekten Klonen wurde die m4-1BB-DNA sequenziert. Der Sequenzvergleich der 4-1BB-Klone zeigte keine Abweichungen von der Sequenz des GenBank-Eintrages.

Mit NheI und XhoI wurde das Gen für m4-1BB aus pCR-II-m4-1BB ausgeschnitten und die kohäsiven DNA-Enden durch T4-DNA-Polymerase aufgefüllt. Das 887 bp *blunt end*-Fragment durch Austausch des RecI-Gens in pGEMTORec1IRESegfp (Sall/NheI, T4-DNA-Polymerase, CIP) kloniert. Nach Verifizierung der Insertion von m4-1BB in *sense* Orientierung wurde die regulierbare Expressionskassette aus pGEMTOm4-1BBIRESegfp mit SmaI und NruI ausgeschnitten und das 3518 bp Fragment in die deletierte E1-Region von pAdcos45 kloniert. Für diese Insertion wurde pAdcos45 zuvor mit XbaI inkubiert, die kohäsiven XbaI-Enden durch T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und mit CIP dephosphoryliert. Der Vektor wurde nach Kontrolle als pAdcosTOm4-1BBIRESegfp bezeichnet.

Tab. 3.3: Zusammenfassung der Klonierung der rekombinanten Adenoviren mit kostimulatorischen Molekülen. Der CMV-TO-Promotor wurde durch Austausch des SnaI/SpeI-Fragmentes aus pcDNA4TOmychisA (Invitrogen) mit dem SnaI/AvrII-Fragmentes aus pGEMmRANKIRESegfp bzw. pGEMmRANKLIRESegfp in pGEMTOmRANKIRESegfp und pGEMTOmRANKLIRESegfp kloniert.

Gen	Herkunft und Subklonierung	Expressionskassetten-Vektor	Expressionskassetten-Plasmid	Adenocosmidvektor	rekomb. adenoviraler Cosmidvektor	rekomb. Virus
murine CD40	PCR-Fragment (937 bp) in pCR-II, NheI/XhoI, T4-DNA-Polymerase (928 bp)	pGEMTORec1IRESegfp, SmaI/NheI, CIP (5637 bp)	pGEMTOmCD40IRESegfp, Psp1406I/XbaI (3524 bp)	pAdcos45, ClaI/XbaI, CIP (36008 bp)	pAdcosTOmCD40 IRESegfp (39532 bp)	AdCD40 (33340 bp)
murine CD40L	PCR-Fragment (811 bp) in pCR-II, NheI/XhoI, T4-DNA-Polymerase (802 bp)	pGEMTORec1IRESegfp, SmaI/NheI, CIP (5637 bp)	pGEMTOmCD40LIRESegfp, SmaI/XbaI (3390 bp)	pAdcos45Rec1IRESegfp, SmaI/XbaI, CIP (36016 bp)	pAdcosTOmCD40L IRESegfp (39406 bp)	AdCD40L (33214 bp)
murine 4-1BB	PCR-Fragment (900 bp) in pCR-II, NheI/XhoI, T4-DNA-Polymerase (891 bp)	pGEMTORec1IRESegfp, SmaI/NheI, CIP (5637 bp)	pGEMTOm4-1BBIRESegfp, SmaI/XbaI (3518 bp)	pAdcos45, XbaI, T4-DNA-Polymerase, CIP (36034 bp)	pAdcosTOm4-1BB IRESegfp (39552 bp)	
murine 4-1BBL	PCR-Fragment (988 bp) in pCR-II, NheI/XhoI, T4-DNA-Polymerase (979 bp)	pGEMTORec1IRESegfp, SmaI/NheI, CIP (5637 bp)	pGEMTOm4-1BBL IRESegfp, Psp1406I/XbaI (3575 bp)	pAdcos45, ClaI/XbaI, CIP (36008 bp)	pAdcosTOm4-1BBL IRESegfp (39583 bp)	Ad4-1BBL (33391 bp)
murine RANK	pDC409 (Immunex), NheI/EcoRV, T4-DNA-Polymerase (2012 bp)	pGEMIRESegfp, SmaI, CIP (5608 bp)	pGEMTOmRANKIRESegfp, Psp1406I/XbaI (4669 bp)	pAdcos45, ClaI/XbaI, CIP (36008 bp)	pAdcosTOmRANK IRESegfp (40677 bp)	AdRANK (34485 bp)
murine RANKL	pBS-mRANKL (Immunex) SalI (1772 bp)	pGEMIRESegfp, SmaI, CIP (5608 bp)	pGEMTOmRANKLIRESegfp, Psp1406I/XbaI (4428 bp)	pAdcos45, ClaI/XbaI, CIP (36008 bp)	pAdcosTOmRANKL IRESegfp (40436 bp)	AdRANKL (34244 bp)

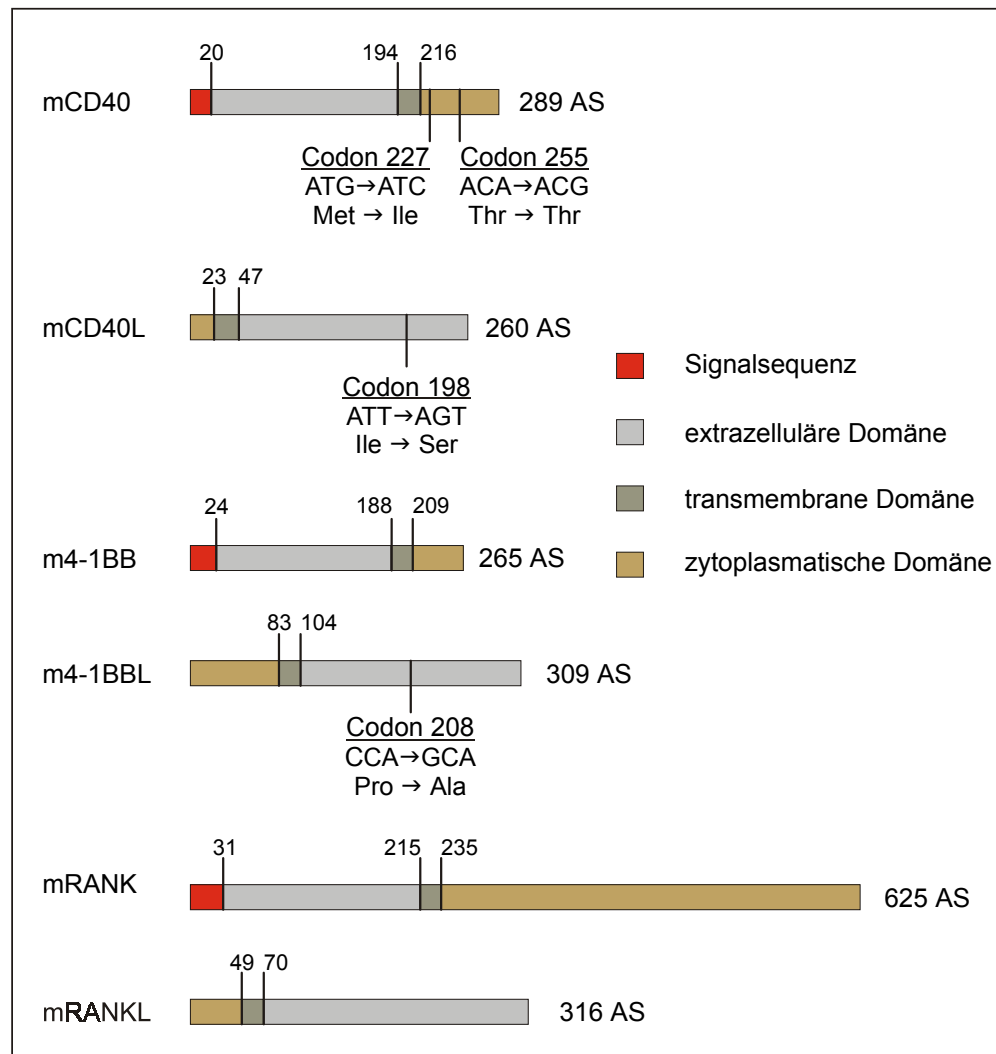


Abb. 3.11: Schematische Darstellung der Proteinstruktur der kostimulatorischen Moleküle der TNF- bzw. TNFR-Superfamilie mit den gefundenen Abweichungen von den jeweiligen GenBank-Sequenzen. Erläuterungen siehe Text.

3.2.1.4 Klonierung von pAdcosTom4-1BBLIRESegfp

Anhand der GenBank-Sequenz L15435 wurden die für das murine 4-1BBL (m4-1BBL) spezifischen Oligonukleotid-Primer mit NheI- im 5'-Primer bzw. XhoI-Schnittstelle im 3'-Primer entwickelt (siehe Tab. 2.1). Die DNA codierend für m4-1BBL wurde mittels PCR aus der Lymphozyten-cDNA isoliert und das 981 bp große PCR-Produkt in pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen) kloniert. Nach Kontrolle der Struktur durch Restriktionskartierung wurde die m4-1BBL-DNA aus pCR-II-m4-1BBL sequenziert. Dabei wurde im Vergleich zur GenBank-Sequenz in allen Klonen eine Mutation im Codon 208 (CCA→GCA) detektiert (Abb. 3.11), die zu einer Veränderung der AS-Sequenz (Pro→Ala) führt. Diese Modifikation des Codon 208 in m4-1BBL war zum Zeitpunkt der Arbeit nicht beschrieben. Ob diese AS-Substitution in der extrazellulären Domäne einen Einfluß auf die Funktionalität besitzt, konnte anhand der Literatur nicht geklärt werden. Die *in vivo* Experimente (3.5.1) sowie die FACS-Daten (3.3.3) mit Ad4-1BBL-infizierten dendritischen Zellen verdeutlicht, daß diese AS-Substitution nicht die Funktionalität beeinträchtigte. Bei der detektierten Mutation in der Sequenz von m4-1BBL könnte es sich um ein Artefakt aus der cDNA-Synthese bzw. PCR handeln. Die beschriebenen

Mutationen für mCD40 und mCD40L, die in GenBank beschrieben sind, deuten aber auch auf eine gewisse genetische Variabilität hin, die auch in einem Inzuchtstamm auftreten können, insbesondere wenn Mäuse von unterschiedlichen Quellen bezogen werden.

Die Exzision der m4-1BBL-DNA aus pCR-II-m4-1BBL erfolgte mit NheI und XhoI. Durch T4-DNA-Polymerase wurde das 975 bp Fragment in ein *blunt end*-Fragment modifiziert und durch Austausch mit dem Rec1-Gen in pGEMTORec1IRESegfp (SalI/NheI, T4-DNA-Polymerase, CIP) kloniert. Die Struktur der regulierbaren bicistronischen Expressionskassette von pGEMTOm4-1BBLIRESegfp wurde kontrolliert und für die Insertion in pAdcos45 (ClaI/XbaI, CIP) mit Psp1406I und XbaI ausgeschnitten (3575 bp Fragment). Der entstandene adenovirale Cosmidvektor wurde als pAdcosTOm4-1BBLIRESegfp bezeichnet.

3.2.1.5 Klonierung von pAdcosTOmRANKIRESegfp

Die Klonierung von pAdcosTOmRANKIRESegfp wurde von Borris Haupt im Rahmen seiner Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Lindenmaier/Dittmar durchgeführt. Aus diesem Grund wird in diesem Kapitel nur sehr kurz die Konstruktion beschrieben.

Die DNA codierend für das murine RANK (mRANK) wurde aus pDC409 (Immunex) mit NheI und EcoRV ausgeschnitten und die kohäsiven DNA-Enden mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt. Das *blunt end*-Fragment (1772 bp) wurde in pGEMIRESegfp kloniert, der zuvor mit SmaI linearisiert und dephosphoryliert wurde. Die Struktur von pGEMmRANKIRESegfp wurde durch Restriktionskartierung kontrolliert. Für die Herstellung einer regulierbaren Expressionseinheit wurde aus pGEMmRANKIRESegfp mit SnaI und AvrII ein Fragment des CMV-Promotors ausgeschnitten und durch ein entsprechendes Fragment mit tetO aus SnaI/SpeI behandeltem pcDNA4TomyhisA (Invitrogen) ersetzt, so daß pGEMTOmRANKIRESegfp eine regulierbare bicistronische Expressionseinheit aus CMV-TO-Promotor, mRANK, IRES-Element und egfp enthält. Für die Insertion in die deletierte E1-Region von pAdcos45 (ClaI/XbaI, CIP) wurde diese Expressionskassette (4669 bp) mit Psp1406I und ClaI ausgeschnitten. Nach Charakterisierung der DNA-Struktur wurde der Vektor als pAdcosTOmRANKIRESegfp bezeichnet.

3.2.1.6 Klonierung von pAdcosTOmRANKLIRESegfp

Auch pAdcosTOmRANKLIRESegfp wurde von Borris Haupt im Rahmen seiner Diplomarbeit generiert.

Das Gen für das murine RANKL (mRANKL) wurde mit SalI aus pBS-mRANKL (Immunex) ausgeschnitten und das 1772 bp große mRANKL-Fragment in den mit SalI linearisierten und dephosphorylierten pGEMIRESegfp kloniert. Nach der Kontrolle der DNA-Struktur wurde pGEMmRANKLIRESegfp mit SnaI und AvrII gespalten und das entfernte Fragment des CMV-Promotors durch ein entsprechendes Fragment mit tetO aus SnaI/SpeI behandelten pcDNA4TomyhisA (Invitrogen) ersetzt, und der resultierende Vektor mit der regulierbaren Expressionskassette als pGEMTOmRANKLIRESegfp bezeichnet. Für die Insertion dieser Expressionskassette in den Adenocosmidvektor wurde pGEMTOmRANKLIRESegfp mit Psp1406I und XbaI gespalten und das 4428 bp Fragment in die deletierte E1-Region von pAdcos45 (ClaI/XbaI, CIP) kloniert. Der entstandene Vektor wurde nach Kontrolle der Struktur als pAdcosTOmRANKLIRESegfp bezeichnet.

3.2.2 Herstellung und Aufreinigung replikationsdefizienter Adenoviren mit kostimulatorischen Molekülen

Für die Herstellung der rekombinanten Adenoviren, die kostimulatorische Moleküle codieren, wurde wie zuvor (3.1.3) die amplifizierte, aufgereinigte und charakterisierte Adenocosmid-DNA in die 293LP Produktionszellelinie transfiziert. Die Transfektion mittels Calciumphosphat-DNA-Kopräzipitation zur Herstellung des primären Adenovirusstocks erfolgte entweder mit der Cosmid-DNA alleine oder simultan mit dem Tet-R codierenden Plasmid pcDNA6/Tet-R (Abb. 3.12 A), um durch die Bindung des Tet-R an dem CMV-TO-Promotor die Transgen-Expression zu reprimieren. Durch die Repression sollten mögliche biologische Effekte, die wie für RANK beobachtet auf der Überexpression des Transgens beruhten und die Virusbildung inhibierten, minimiert werden.

Nach der Transfektion wurden erneut primäre Adenovirusstocks hergestellt (3.2.2.1) und die DNA-Struktur sowie Funktionalität der hergestellten rekombinanten Adenoviren charakterisiert (3.2.3), bevor die dialysierten hochtitrigen CsCl-gereinigte Stocks (3.2.2.2) hergestellt wurden.

3.2.2.1 Herstellung primärer Adenovirusstocks unter Repression der Transgen-Expression

Die Herstellung der replikationsdefizienten rekombinanten Adenoviren mit kostimulatorischen Molekülen erfolgte wie unter 3.1.3.1. Die Transfektion für jedes adenovirale Cosmid-Konstrukt erfolgte in zwei unabhängigen Transfektionen, die sich durch die Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Tetracyclin-Repressors unterschieden (Abb. 3.12 A). Der Vergleich dieser beiden Ansätze sollte zeigen, ob die Expression des Transgens nach der Transfektion in Abwesenheit des Repressors die primäre Virusbildung unterbindet, wie in der Diplomarbeit von Borris Haupt für RANK beobachtet wurde. Um die Expression der kostimulatorischen Moleküle zu reprimieren, wurden die 293LP Zellen simultan mit der Adenocosmid-DNA und pcDNA6/Tet-R (Invitrogen) kotransfiziert. Für die Kotransfektion wurde ein molares Verhältnis der Cosmid-DNA zu pcDNA6/Tet-R von 1:6 gewählt, um zu gewährleisten, daß alle mit der Cosmid-DNA transfizierten Zellen gleichzeitig mindestens eine Kopie des Repressorplasmids enthielten. Die Transfektanten wurden wie die zuvor beschriebenen Transfektionen weiterkultiviert und die EGFP-Expression regelmäßig am Fluoreszenzmikroskop kontrolliert.

Am Tag 3 nach der Transfektion wurde die Transfektionseffizienz anhand der EGFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch abgeschätzt (Abb. 3.12 B). Dabei zeigte sich, daß in den Ansätzen ohne pcDNA6/Tet-R zwischen 5-20% der Zellen EGFP-positiv waren. In den Transfektionsansätzen mit pcDNA6/Tet-R konnte dagegen nur eine sehr schwache EGFP-Fluoreszenz beobachtet werden, was auf die effiziente Repression der Transgen-Expression zurückzuführen sein könnte. Eine geringere Transfektionseffizienz als Ursache für die Reduktion der EGFP-Fluoreszenz in diesen Ansätzen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die EGFP-Fluoreszenzintensität, wie auch die Anzahl der EGFP-positiven Zellen blieb unter den reprimierenden Bedingungen bis zum Auftreten der ersten adenoviralen Plaques kaum nachweisbar. Mit Beginn der Virusproduktion nahm jedoch die Intensität der EGFP-Fluoreszenz und Anzahl an EGFP-positiven Zellen zu und war zum Zeitpunkt der Zellernte für die Herstellung des primären Virusstocks vergleichbar mit der unter nicht-reprimierten Bedingungen. Die Zunahme EGFP-exprimierender Zellen nach

dem Auftreten der ersten Plaques könnte auf der Infektion von Zellen mit freigesetzten rekombinanten Adenoviren, die nicht mit pcDNA6/Tet-R transfiziert wurden und daher keinen Tet-R exprimieren, beruhen. Die Zunahme der EGFP-Fluoreszenzintensität könnte auf die im Verlauf der viralen DNA-Replikation gestiegene Kopienzahl adenoviraler Genome bei gleichbleibender Expression des Tet-R in den Transfektanten zurückzuführen sein, so daß nicht mehr ausreichend Repressor-Moleküle für eine Bindung an alle CMV-TO-Promotoren in der Zelle vorlag.

Die ersten adenoviralen Plaques wurden am Tag 11 nach der Transfektion detektiert, und innerhalb der nächsten 4-5 Tage wiesen alle Konstrukte bis auf die beiden Ansätze mit pAdcosTOM4-1BBLIRESegfp die ersten Plaques auf. Bezüglich des zeitlichen Verlaufs der primären Virusbildung zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden unabhängigen Transfektionen, die auf einen Effekt der Transgen-Expression hindeuteten. Beim Kotransfektionsansatz von pAdcosTOMCD40LIRESegfp mit pcDNA6/Tet-R wurden die ersten Plaques erst am Tag 24 nach der Transfektion detektiert. Da die Transfektionseffizienz unter den reprimierten Bedingungen nicht ermittelt werden konnte und die Virusbildung bei Verwendung zirkulärer Cosmid-DNA ein statistisch seltenes Ereignis ist, könnte in diesem Fall eine geringere Transfektionseffizienz die Virusproduktion zeitlich verzögert haben. Die Präparation der primären Adenovirusstocks erfolgte, wenn eine ausreichende Anzahl der Zellen zytopathische Merkmale zeigten. Die Benennung der hergestellten rekombinanten Adenoviren erfolgte nach dem jeweiligen ersten Cistron (AdCD40, AdCD40L, Ad4-1BBL). Bevor die Herstellung hochtitriger Adenovirusstocks erfolgte, wurden weitere 293 Zellen mit den primären Adenovirusstocks infiziert, um die Struktur des adenoviralen Genoms der gewonnenen rekombinanten Adenoviren zu kontrollieren (3.2.3.1).

In den Transfektionsansätzen mit pAdcosTOM4-1BBIRESegfp konnten weder in Abwesenheit noch in Anwesenheit von Tet-R bis zum Tag 35 nach der Transfektion virale Plaques detektiert werden. Es fiel auf, daß in den ersten 5 Tagen nach der Transfektion unabhängig vom Tet-R ein vermehrtes Abrunden und Ablösen der Transfektanten auftrat. Dies führte unter nicht-reprimierten Bedingungen zu einer gleichzeitigen Abnahme der Zahl transfizierter EGFP-positiver Zellen. Am Ende der Kultivierung war keine EGFP-positive Zelle mehr zu finden. Somit scheint die Überexpression von 4-1BB einen zytopathischen Effekt in den 293 Produktionszellen zu besitzen, der die Produktion rekombinanter Adenoviren unterbindet. Im Gegensatz zu RANK konnte durch die Kotransfektion mit pcDNA6/Tet-R der zytopathischen Effekt von 4-1BB auf die 293 Zellen nicht ausreichend reduziert werden, um das Überleben der transfizierten Zellen und die damit verbundene primäre Virusbildung zu ermöglichen, da auch in Gegenwart des Tet-R die Anzahl der schwach EGFP-positiven Zellen in den ersten Tagen abnahm. Die Ursache für den zytopathischen Effekt von 4-1BB auch im Vergleich zu den anderen kostimulatorischen Molekülen ist unklar.

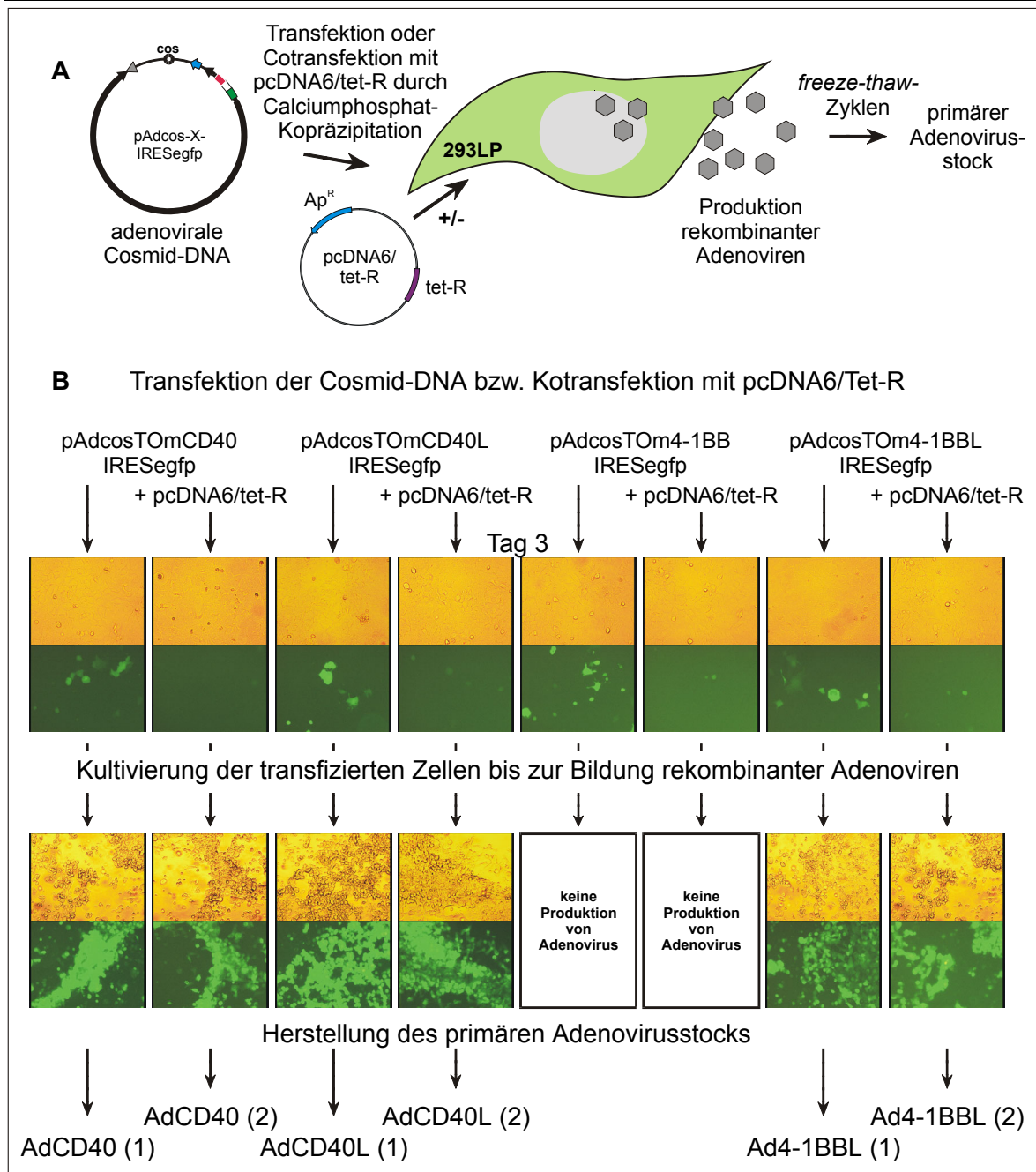


Abb. 3.12: Herstellung der replikationsdefizienten adenoviralen Vektoren, die kostimulatorische Moleküle codieren, nach Transfektion der adenoviralen Cosmid-DNA in 293LP. (A) Schematischer Ablauf der Generierung der primären Adenovirusstocks. (B) 20 µg Cosmid-DNA des jeweiligen Konstruktes wurden entweder alleine oder mit pcDNA6/Tet-R im molarem Verhältnis der Cosmid-DNA zu pcDNA6/Tet-R von 1:6 in 293LP kotransfiziert. Am Tag 3 wurde die Transfektionseffizienz bzw. die Repressionseffizienz anhand der EGFP-Expression am Fluoreszenzmikroskop bestimmt und bis zur Bildung der ersten adenoviralen Plaques weiterverfolgt. Die ersten Plaques wurden zwischen 11 und 16 Tagen nach der Transfektion detektiert. Die Benennung der Viren erfolgte basierend auf dem ersten Cistron. Aufnahmen mit 100-facher Vergrößerung.

3.2.2.2 Herstellung dialysierter CsCl-gereinigter Adenovirusstocks

Die Herstellung hochtitriger, dialysierter Stocks der rekombinanten Adenoviren, die murine Mitglieder der TNF- bzw. TNFR-Superfamilie codieren, erfolgte wie zuvor unter 3.1.3.2 beschrieben.

Nach der Aufreinigung und Dialyse der rekombinanten Adenoviren wurde der Virustiter durch Infektion von 293LP Zellen und Bestimmung der Plaque bildenden Einheiten ermittelt. Die ermittelten Titer lagen unabhängig vom verwendeten Konstrukt zwischen 1×10^{10} und 8×10^{10} PFU/ml und die Ausbeute pro 16 Zellkulturflaschen (175 cm^2) betrug zwischen 5×10^9 und 2×10^{10} PFU.

3.2.3 Charakterisierung der rekombinanten Adenoviren und Expressionsnachweis der kostimulatorischen Molekülen

Die Identität und Struktur der adenoviralen Vektoren mit kostimulatorischen Molekülen wurde durch Restriktionskartierung der viralen DNA kontrolliert (3.2.3.1). Die Funktionalität der Vektoren wurde durch Analyse der Transgen-Expression durch immunozytochemische Färbungen nachgewiesen.

3.2.3.1 Präparation und Charakterisierung der adenoviralen DNA

Die Präparation der DNA aus infizierten Zellen erfolgte wie zuvor (3.1.4.1), und durch Restriktionskartierung wurden die Restriktionsmuster der adenoviralen DNAs mit denen der Adenocosmid-DNAs verglichen.

Tab. 3.4: Erwartete Restriktionsmuster der jeweiligen linearen Adenovirus-DNA oder zirkulären Adenocosmid-DNA nach Doppelverdau mit SmaI und XbaI. Die grau unterlegten DNA-Fragmente entsprechen den jeweiligen Expressionskassetten.

DNA	Restriktionsmuster nach Behandlung mit SmaI + XbaI		
AdCd40	29487 bp	3516 bp	337 bp
pAdcosTOMCD40IRESegfp	36016 bp	3516 bp	
AdCD40L	29487 bp	3390 bp	337 bp
pAdcosTOMCD40LIRESegfp	36016 bp	3390 bp	
Ad4-1BBL	29487 bp	3567 bp	337 bp
pAdcosTOM4-1BBLIRESegfp	36016 bp	3567 bp	

Zur Kontrolle der Struktur des adenoviralen Genoms wurden die Adenovirus-DNAs mit HindIII gespalten (nicht gezeigt). Die Anwesenheit der inserierten Expressionskassette wurde durch Inkubation der Adenovirus-DNAs mit SmaI und XbaI kontrolliert (Abb. 3.13). Wie schon unter 3.1.4.1 erläutert, sind die Abweichungen im Restriktionsmuster der zirkulären Adenocosmid-DNA von dem der präparierten Adenovirus-DNA (siehe Tab. 3.4) charakteristisch für die Adenovirus-DNA, da die prokaryontischen Sequenzen der zirkulären Adenocosmid-DNA außerhalb der ITRs bei der viralen DNA-Replikation nicht repliziert werden (Abb. 3.13 A). Unter den in Abb. 3.5 B dargestellten elektrophoretischen Bedingungen war der Unterschied zwischen den 36016 bp Fragmenten der zirkulären Adenocosmid-DNAs und den 29487 bp Fragmenten der linearen Adenovirus-DNAs ebenso wie das kleine 337 bp DNA-Fragment (linkes ITR bis SmaI-Restriktionsschnittstelle) nicht erkennbar. Die Fragmentgrößen der mit SmaI und XbaI aus den Adenovirus-DNAs ausgeschnittenen Expressionskassetten stimmte mit den erwarteten Werten und dem der entsprechenden Adenocosmid-DNAs überein. Bei dem

DNA-Schmier in den Ansätzen mit Adenovirus-DNAs bzw. Mock handelt es sich um chromosomale DNA aus den Zellen.

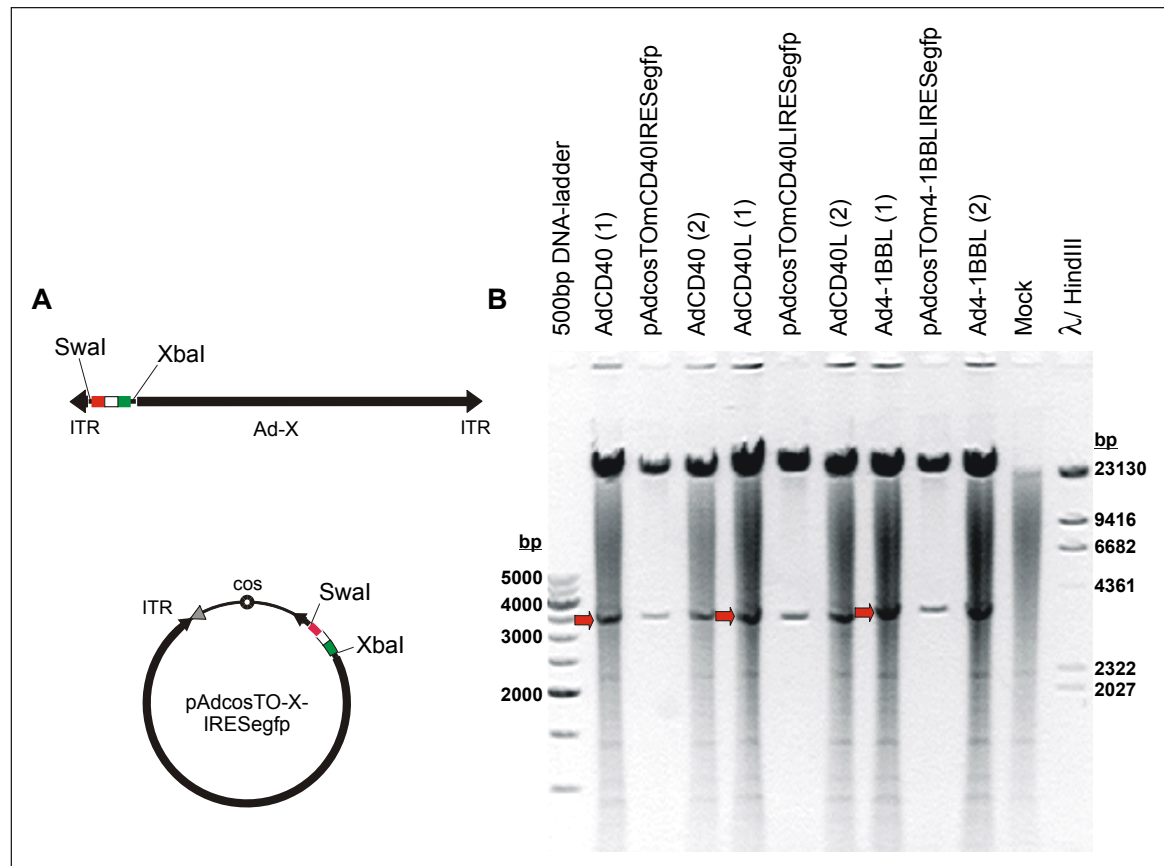


Abb. 3.13: Charakterisierung der adenoviralen DNA der rekombinanten Vektoren mit kostimulatorischen Molekülen. (A) Vergleich der linearen Adenovirus-DNA die nicht mehr die prokaryontischen Sequenzen außerhalb der beiden ITRs enthält, mit der zirkulären Adenocosmid-DNA. (B) Die gelelektrophoretische Auftrennung der SwaI/XbaI-Restriktionsansätze mit DNAs isoliert aus Zellen, infiziert mit den angegebenen Adenoviren oder Mock bzw. der entsprechenden zirkulären Adenocosmid-DNA. Die erwarteten Restriktionsmuster sind in Tab. 3.4 dargestellt. Die 337 bp Fragmente der linearen Virus-DNAs sowie der Unterschied zwischen den 29487 bp Fragmenten der Virus-DNAs und den 36016 bp Fragmenten Adenocosmid-DNAs sind unter den verwendeten Bedingungen nicht nachweisbar.

Für die Herstellung der hochtitrigen Adenovirusstocks wurden die aus den Kotransfektionsansätzen stammenden primären Stocks verwendet (Abb. 3.12), d.h. AdCD40 (2), AdCD40L (2) und Ad4-1BBL (2).

Die Virus-DNAs der rekombinanten Adenoviren für mRANK und mRANKL wurden hier nicht kontrolliert, da dies bereits in der Diplomarbeit von Borris Haupt erfolgte.

3.2.3.2 Immunozytochemische Färbungen

Für den indirekten Expressionsnachweis der kostimulatorischen Moleküle durch immunozytochemische Färbungen wurden die nicht-permissiven A549 Zellen, die im Gegensatz zu den 293 Zellen nicht die deletierten E1-Genprodukte exprimieren, verwendet, da sie nach Infektion mit replikationsdefizienten Adenoviren keine zytopathischen Effekte zeigen und sich nicht vom Kulturgefäßboden ablösen. Dafür wurden die Zellen mit Verdünnungen der entsprechenden rekombinanten Adenoviren, die kostimulatorische Moleküle codieren, Adegfp oder Mock infiziert. Der Verlauf der Infektion und die EGFP-Expression wurden

am Fluoreszenzmikroskop verfolgt und am Tag 2 nach der Infektion die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Nach der Inkubation mit den entsprechenden primären Antikörpern spezifisch für das jeweilige kostimulatorische Molekül wurde im Falle einer Biotin-Kopplung des primären Antikörpers seine Bindung mit Cy3-gekoppeltem Streptavidin nachgewiesen und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Bei unmarkierten primären Antikörpern wurde das Präparat vor der Detektion mit Cy3-Streptavidin mit einem Biotin-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert.

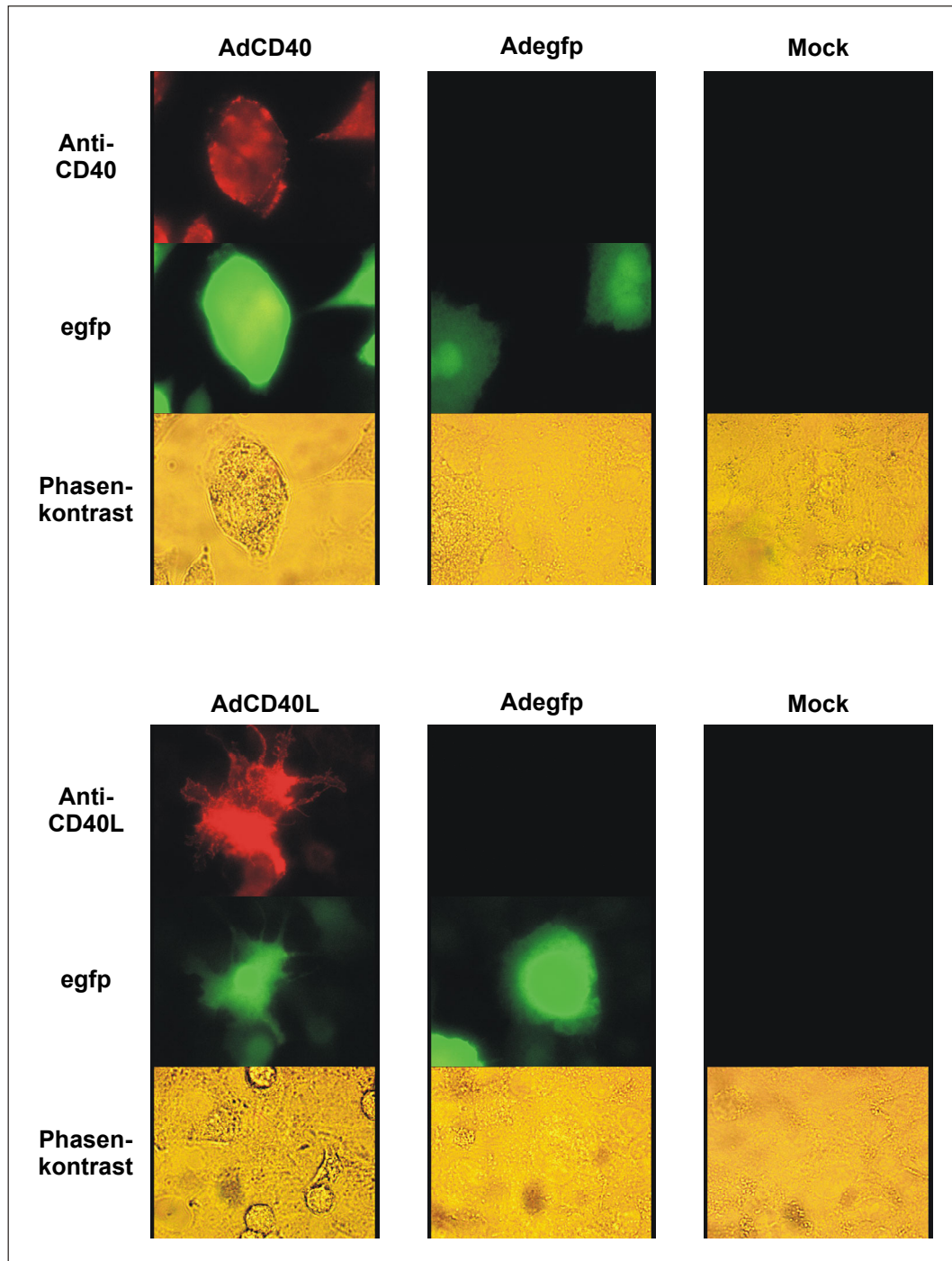


Abb. 3.14: Immunozytochemische Färbungen zum indirekten Nachweis von mCD40 und mCD40L in infizierten A549 Zellen. Zwei Tage nach der Infektion der Zellen mit den entsprechenden rekombinanten Adenoviren wurden die Färbungen, wie unter 2.6.4 beschrieben, durchgeführt. Der Nachweis der Cy3-Emission erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Sowohl CD40 als auch CD40L lagen bevorzugt Membran-assoziiert vor, während die EGFP-Fluoreszenz gleichmäßig im Zytoplasma verteilt vorlag. 400-fache Vergrößerung.

Die Färbungen spezifisch für CD40 und CD40L (Abb. 3.14) zeigten anhand der Cy3-Emission eine eindeutige Expression von mCD40 und mCD40L in den mit AdCD40- bzw. AdCD40L-infizierten Zellen. Die sehr schwache Cy3-Fluoreszenz der Kontrollen demonstrierte, daß die Bindung der Antikörper nicht auf unspezifische Wechselwirkungen mit dem Präparat beruhten. Ein weiteres Indiz für die Spezifität der Färbungen war die Kolokalisation der Cy3-Emission mit der EGFP-Expression als zweitem Cistron in den Expressionskassetten von AdCD40 und AdCD40L. Die EGFP-Fluoreszenz war gleichmäßig im Zytoplasma der infizierten Zellen verteilt, wohingegen die spezifische Cy3-Fluoreszenz von mCD40 und mCD40L bevorzugt in der Zytoplasmamembran lokalisiert war. Da sowohl CD40 als auch CD40L Transmembranproteine sind und somit Membran-assoziiert vorliegen (siehe 1.4), scheint der für die Funktion von CD40 und CD40L essentielle Transport in die Zytoplasmamembran auch in den mit AdCD40 bzw. AdCD40L infizierten A549 Zellen zu erfolgen.

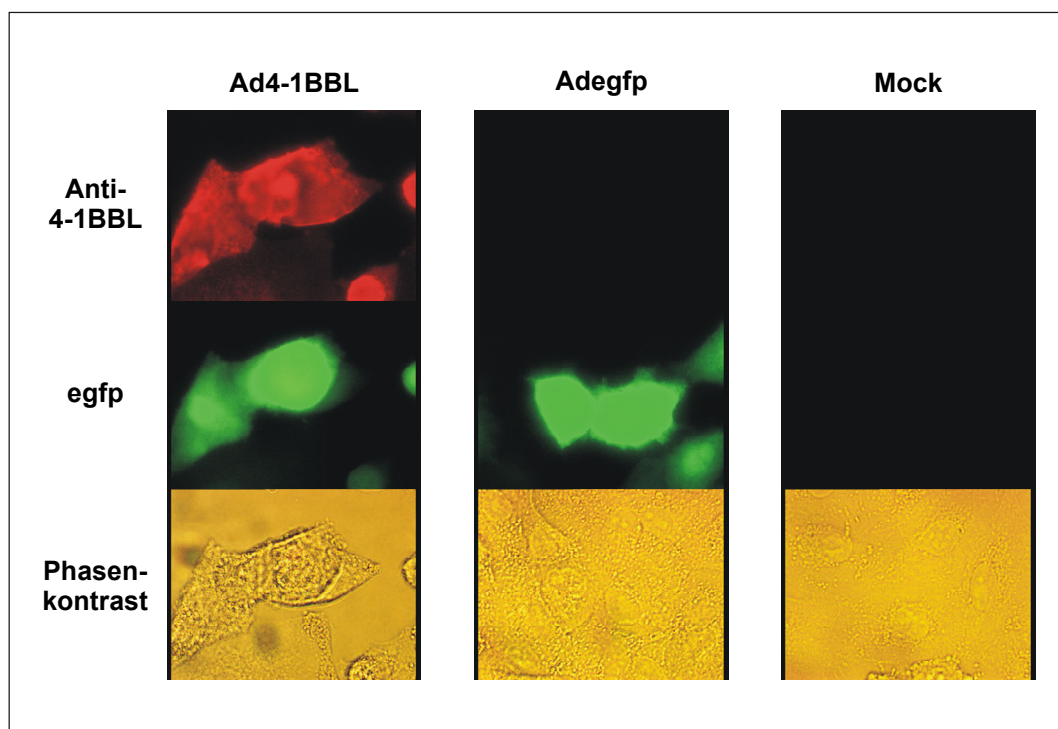


Abb. 3.15: Indirekter Nachweis der m4-1BBL-Expression durch immunozytochemische Färbungen infizierter A549 Zellen. Zwei Tage nach der Infektion der Zellen mit den entsprechenden rekombinanten Adenoviren wurden die Färbungen, wie unter 2.6.4 beschrieben, durchgeführt und die Cy3-Emission am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Während die Fluoreszenz von EGFP zytoplasmatisch vorlag, war die Cy3-Fluoreszenz des detektierten 4-1BBL überwiegend Membran-assoziiert. Aufnahmen mit 400-facher Vergrößerung.

Die m4-1BBL-spezifischen Färbungen (Abb. 3.15) wiesen die eindeutige Expression von m4-1BBL nach Infektion von A549 Zellen mit Ad4-1BBL nach, die sich deutlich von der auf unspezifischen Wechselwirkungen beruhenden Färbung der Zellen unterschied. Die 4-1BBL-Expression wurde durch die Übereinstimmung mit der gleichzeitigen EGFP-Expression bestätigt. Wie zuvor für CD40 und CD40L beschrieben, konnte auch für 4-1BBL eine unterschiedliche Lokalisation in den Zellen im Vergleich zu EGFP beobachtet werden, mit EGFP im Zytoplasma und der Cy3-Emission überwiegend Membran-assoziiert. Die daraus interpretierte Lokalisation von m4-1BBL in der Zytoplasmamembran entspricht der Literatur (siehe 1.4) und ist für die Funktion des

Transmembranproteins als kostimulatorisches Signal während der Interaktion zwischen T-Zellen und dendritischen Zellen von großer Bedeutung.

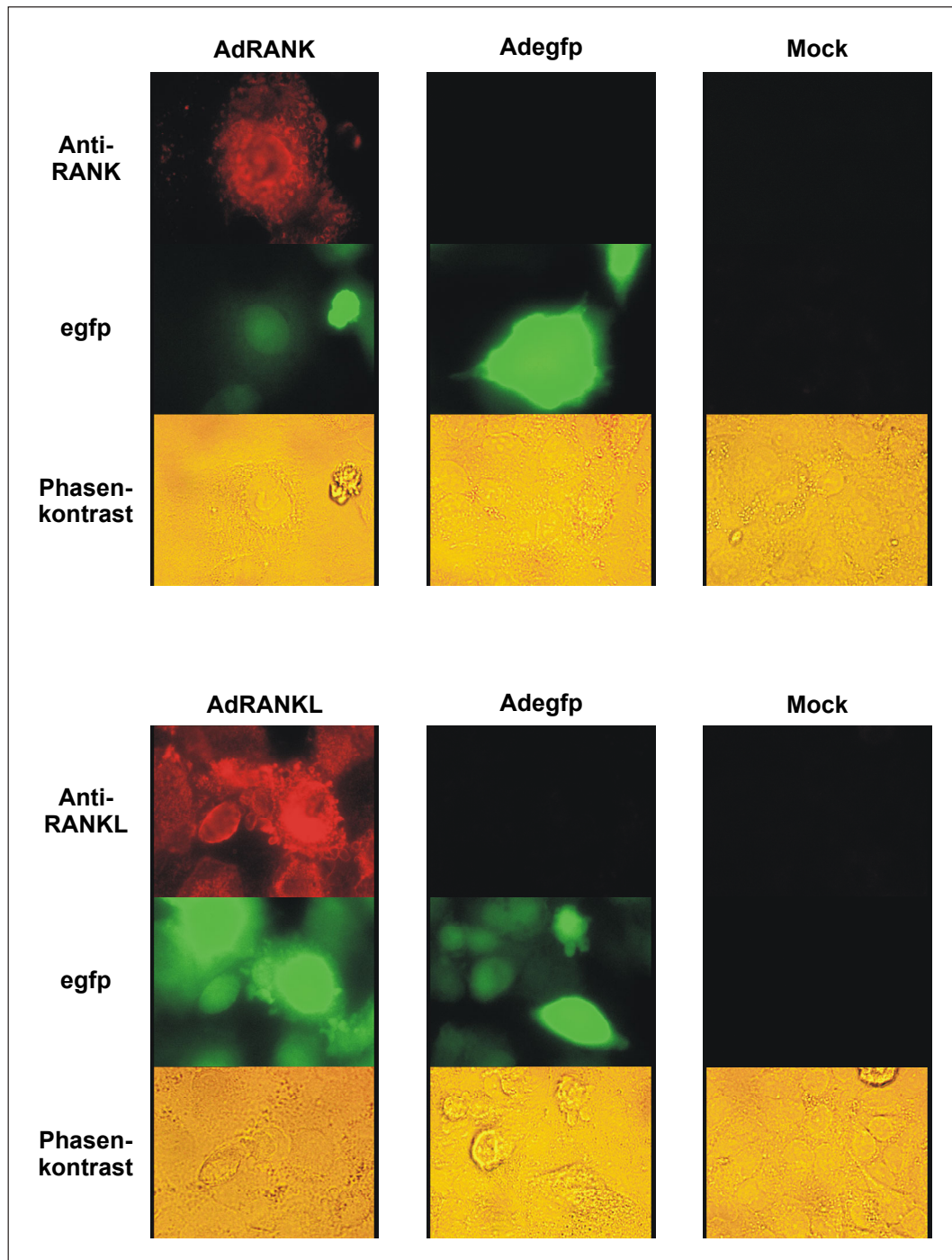


Abb. 3.16: Immunocytochemische Färbungen zum indirekten Nachweis der Expression von mRANK und mRANKL in infizierten A549 Zellen. Zwei Tage nach der Infektion der Zellen mit den entsprechenden rekombinanten Adenoviren wurden die Färbungen, wie unter 2.6.4 beschrieben, durchgeführt. Die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop zeigte die gleichmäßige Verteilung von EGFP im Zytoplasma der infizierten Zellen, wohingegen die Cy3-Emission für mRANK bzw. mRANKL vorwiegend Membran-assoziiert detektiert wurde. 400-fache Vergrößerung.

Die Expression von RANK und RANKL nach Infektion mit den entsprechenden rekombinanten Adenoviren war bereits in der Diplomarbeit von Borris Haupt nachgewiesen worden. Zur Überprüfung und zum Vergleich der Expression der anderen

TNF/TNFR-Moleküle wurden analog immunozytochemische Färbungen infizierter A549 Zellen durchgeführt. In infizierten 293LP Zellen konnte für die beiden Transmembranproteine mRANK und mRANKL eine bevorzugte Membran-assoziierte Lokalisation in der Plasmamembran beobachtet werden, so daß durch der Vergleich von RANK und RANKL mit mCD40, mCD40L und m4-1BBL deren Lokalisation in der Zytoplasmamembran bestätigen könnte. Die Färbungen zum Expressionsnachweis von mRANK und mRANKL (Abb. 3.16) zeigten die spezifische Expression des jeweiligen Transgens in den mit AdRANK- oder AdRANKL-infizierten A549 Zellen. Die Cy3-Emission dieser Zellen konnte als positives Signal interpretiert werden, da die Färbungen der Kontrollen nur eine sehr schwache Cy3-Fluoreszenz aufwiesen. Aber auch die gleichzeitige Expression des zweiten Cistrons in den Expressionskassetten von AdRANK und AdRANKL bestätigte die Spezifität der Färbungen, da nur EGFP-positive Zellen mit Cy3 markiert waren. Die beiden exprimierten Transmembranproteine mRANK und mRANKL wurden, wie bereits in 293LP Zellen gezeigt, bevorzugt in Membranen lokalisiert nachgewiesen, wohingegen die EGFP-Fluoreszenz gleichmäßig im Zytoplasma der infizierten A549 Zelle verteilt war. Der Vergleich der Lokalisation von mRANK und mRANKL mit derjenigen der anderen kostimulatorischen Moleküle führte zu der Interpretation, daß auch mCD40, mCD40L und m4-1BBL Membran-assoziiert vorlagen, und der für ihre Funktion notwendige Transport in die Zytoplasmamembran in den Adenovirus-infizierten Zellen erfolgte.

Die Ergebnisse in diesem Kapitel haben gezeigt, daß replikationsdefiziente adenovirale Vektoren, die für murine Mitglieder der TNF- bzw. TNFR-Superfamilie codieren, hergestellt und aufgereinigt werden konnten. Die Insertion der entsprechenden Expressionskassetten in das adenovirale Genom wurde durch die Restriktionskartierung der isolierten Adenovirus-DNAs bestätigt. Die Expression von mCD40, mCD40L, m4-1BBL, mRANK und mRANKL konnte durch immunozytochemische Färbungen infizierter A549 Zellen nachgewiesen werden. Die für die Funktion der transmembranen TNF/TNFR-Moleküle essentielle Integration in die Zytoplasmamembran konnte in den infizierten Zellen durch den Vergleich mit der Lokalisation der EGFP-Fluoreszenz gezeigt werden. Die adenoviralen Vektoren mit kostimulatorischen Molekülen standen damit für die Versuche zur genetischen Modifikation von dendritischen Zellen zur Verfügung.

Für die Herstellung dieser adenoviralen Konstrukte wurden regulierbare Expressionskassetten generiert. Durch die Kotransfektion der Adenocosmid-DNA mit dem Plasmid des Repressors in die 293 Produktionszellen konnte die Transgen-Expression effizient reprimiert werden. Die Versuche zur Herstellung eines rekombinanten Adenovirus, der das murine 4-1BB codiert, blieben erfolglos. Von den zwei voneinander unabhängigen Transfektionen mit der Adenocosmid-DNA, die jeweils im Parallelversuch unter reprimierten bzw. nicht-reprimierten Bedingungen durchgeführt wurden, führte keine zur Bildung von Viren. Auffällig war dabei die Abnahme der Anzahl EGFP-positiver Transfektanten, die sich bereits in den ersten 5 Tagen nach der Transfektion abrundeten und ablösten. Zum Zeitpunkt der Initiation der adenoviralen DNA-Replikation (zwischen Tag 8 und 10 nach der Transfektion) konnten in den Transfektionsansätzen keine EGFP-positiven Zellen mehr detektiert werden. Wegen der Erfahrungen mit der Herstellung des rekombinanten Adenovirus für RANK, könnte auch für 4-1BB das Absterben der Zellen auf einen

zytopathischen Effekt des exprimierten 4-1BB zurückzuführen sein. Selbst bei der Verwendung des Tetracyclin-abhängigen Expressionssystems mit dem die Transgen-Expression effizient reprimiert werden konnte, scheint das basale Expressionsniveau noch zu hoch zu sein, da 4-1BB im Gegensatz zu RANK auch unter diesen Bedingungen noch zytopathisch auf die Produktionszellen wirkte.

3.3 Infektion dendritischer Zellen mit adenoviralen Vektoren

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer therapeutischen Immunisierung gegen Tumore und persistierende Virusinfektionen mit dendritischen Zellen. In den bisherigen Kapiteln wurde die Herstellung und Charakterisierung adenoviraler Vektoren erläutert, die der genetischen Modifikation der dendritischen Zellen dienen sollten. Die Isolierung und Kultivierung dendritischer Zellen sowie ihre genetische Modifikation durch Infektion mit rekombinanten Adenoviren soll in diesem Kapitel beschrieben werden. Weiterhin sollte für die späteren *in vivo* Experimente zur Induktion einer HPV-16-spezifischen Immunantwort die Expression der HPV-16 Sequenzen in infizierten dendritischen Zellen nachgewiesen und der Einfluß der kostimulatorischen Moleküle auf die dendritischen Zellen untersucht werden.

3.3.1 Generierung muriner dendritischer Zellen und deren Infektion mit adenoviralen Vektoren

Für die Generierung dendritischer Zellen stehen unterschiedliche Organe der Maus, wie Knochenmark, Haut, Milz oder Thymus, zur Verfügung (siehe 1.3.7). Die Gewinnung dendritischer Zellen aus der Kultivierung isolierter Knochenmarksvorläuferzellen bietet im Vergleich zur Gewinnung aus den anderen Organen die Möglichkeit, größere Mengen an dendritischen Zellen zu gewinnen, die sich zudem in einem homogenen Reifungszustand befinden. Da reife dendritische Zellen effizienter T-Zellen aktivieren können, ist die Ausreifung bzw. der Differenzierungszustand der dendritischen Zellen für immuntherapeutische Einsätze von Bedeutung. Abhängig von Art und Dauer der Kultivierung können sowohl unreife als auch reife dendritische Zellen gewonnen werden.

Eine geeignete Methode wurde ausgehend von Protokollen von Inaba et al.¹²⁹ und Lutz et al.¹⁵⁸ entwickelt. Die Vorläuferzellen der murinen dendritischen Zellen wurden aus dem Knochenmark nach Depletion der Erythrozyten in Anwesenheit der Zytokine *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) und Interleukin 4 (IL-4) kultiviert, ohne eine weitere Depletion kontaminierender Zelltypen wie z.B. Lymphozyten. Die isolierten Zellen wurden insgesamt für sechs Tage in Anwesenheit der Zytokine kultiviert, wobei alle zwei Tage 80 % des Kulturmedium mit Zytokinen erneuert wurde. Das CD11c-Antigen diente als Marker für dendritische Zellen da es hauptsächlich in dendritischen Zellen exprimiert wird. CD11c kommt aber auch in einzelnen Subpopulationen von Lymphozyten vor^{149,150}. Um Subpopulationen zu identifizieren, wurden die Zellen für die FACS-Analyse neben der Markierung gegen das CD11c-Antigen noch mit einem zweiten Antikörper gegen MHC II (*major histocompatibility complex class II molecules*) markiert. Die MHC II-Expression auf der Zelloberfläche der dendritischen Zellen ist vom Differenzierungszustand der Zellen abhängig. So wird das zunächst intrazelluläre MHC II der

unreifen dendritischen Zellen während der Differenzierung in reife Zellen an die Zelloberfläche transportiert (siehe 1.3). Die zusätzliche Markierung der Zellen gegen MHC II diente somit in Kombination mit CD11c zur eindeutigeren Identifizierung der dendritischen Zellen und ihres Differenzierungsgrads.

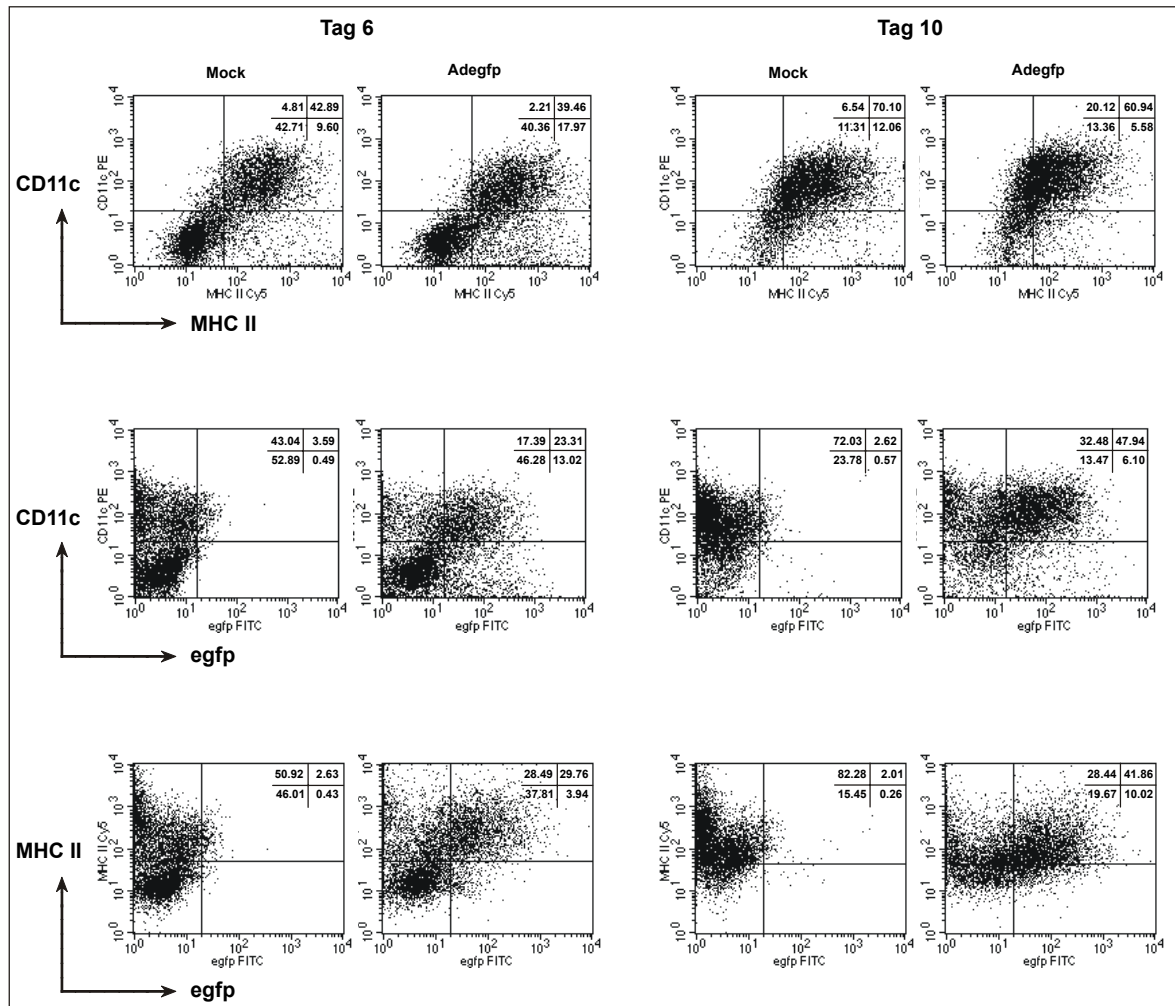


Abb. 3.17: Nachweis der Reifung und Infizierbarkeit von dendritischen Zellen. Murine dendritische Zellen wurden durch Kultivierung von Knochenmarksvorläuferzellen in Anwesenheit der GM-CSF und IL-4 generiert. Die Infektion mit Adegfp (MOI 100) oder Mock erfolgte am Tag 4 nach der Isolation. Die FACS-Analyse zur Identifizierung der CD11c⁺/MHC II⁺ dendritischen Zellen wurde am Tag 6 und Tag 10 mit Antikörpern spezifisch für CD11c (PE-Markierung) oder MHC II (Biotin-Markierung mit Cy5-Streptavidin) durchgeführt und die Infektion über EGFP-exprimierende Zellen bestimmt.

Der Einfluß der Kultivierungsdauer auf den Anteil der dendritischen Zellen wurde durch den Vergleich der Tag 6 Kulturen mit Tag 10 Kulturen durchgeführt (Abb. 3.17). Die Infizierbarkeit der dendritischen Zellen und der Einfluß der Infektion mit adenoviralen Vektoren wurden demonstriert, indem die Zellen am Tag 4 nach der Isolierung mit Adegfp bzw. Mock infiziert und anschließend bis zur FACS-Analyse weiterkultiviert wurden. Für die Infektion mit Adegfp, der eine monocistronische Expressionskassette mit dem egfp-Reportergen unter Kontrolle des CMV-Promotors enthält, wurde eine *multiplicity of infection* (MOI) von 100 gewählt. Die Analyse der Zellen im FACS zeigte, daß der Anteil an CD11c⁺/MHC II⁺-Zellen am Tag 6 nach der Isolierung 42,89 % (Mock) bzw. 39,46 % (Adegfp) betrug. Die Doppelfärbungen zeigten weiterhin, daß von den CD11c⁺-Zellen nur etwa 5-10 % negativ für MHC II waren. Dies demonstriert, daß es sich bei den

CD11c⁺-Zellen tatsächlich um dendritische Zellen handelte. Der relative Anteil der CD11c⁺/MHC II⁺-Zellen nahm bis Tag 10 auf 70,1 % (Mock) bzw. 60,44 % (Adeqfp) zu. Diese Zunahme des Anteil an reifen dendritischen Zellen bestätigte die Abhängigkeit des Differenzierungsgrads der Zellen von der Kultivierungsdauer. Der Vergleich der Tag 10 FACS-Diagramme mit denen vom Tag 6 zeigte durch die Abnahme der CD11c⁺/MHC II⁺-Zellen im unteren linken Quadrant auch eine deutliche Zunahme der Homogenität in den dendritischen Zellkulturen.

Zur Demonstration der Infizierbarkeit der dendritischen Zellen und zur Bestimmung der Infektionsrate wurde der Anteil an EGFP⁺-Zellen unter den CD11c⁺- bzw. MHC II⁺-Zellen analysiert (Abb. 3.17). Wegen der Autofluoreszenz der Zellen war eine eindeutige Unterteilung in eine negative und positive Population problematisch. So wurden die Quadranten so gewählt, daß am Tag 6 3,56 % bzw. 2,62 % am Tag 10 der CD11c⁺-Zellen im FITC-Kanal positiv waren. Der Anteil der grünfluoreszierenden CD11c⁺-Zellen stieg nach der Infektion mit Adeqfp auf 23,31 % (Tag 6) bzw. 47,94 % (Tag 10). Bezogen auf die gesamten CD11c⁺-Zellen am Tag 6 (17,39 % + 23,31 %) bedeutet dies, daß mindestens 57 % der CD11c⁺-Zellen mit Adeqfp infiziert waren und das Transgen exprimierten. Bei den 13,02 % EGFP⁺/CD11c⁻-Zellen könnte es sich um kontaminierende Zelltypen, z.B. Makrophagen handeln, die ebenfalls mit Adenovirus infizierbar sind. Wie bereits zuvor beobachtet, nimmt der relative Anteil der CD11c⁻-Zellen mit zunehmender Kultivierungsdauer ab. Der relative Anteil der EGFP⁺/CD11c⁻-Zellen betrug am Tag 10 nur noch 6,1 %. Der Anteil der infizierten CD11c⁺-Zellen blieb dagegen stabil. 55,6 % der CD11c⁺-Zellen exprimierten noch EGFP. Dies zeigte, daß die Expression des Reportergens bereits 2 Tage nach der Infektion hoch genug war, um die infizierten Zellen zu detektieren. Die Auswertung der Infektionsraten bezogen auf MHC II⁺-Zellen stimmte mit den Ergebnissen für CD11c⁺-Zellen überein. So exprimierten am Tag 6 51,1 % (28,49 % + 29,76 %) bzw. am Tag 10 59,5 % (29,44 % + 41,86 %) der MHC II⁺-Zellen EGFP.

Interessant war die beobachtete Abnahme der CD11c⁺/MHC II⁺-Zellen nach Infektion mit Adeqfp am Tag 10 um ca. 10 % im Vergleich zu den Mock-infizierten Zellen (70,1 %), was als negativer Effekt der adenoviralen Infektion gedeutet werden könnte. Ein Vergleich des relativen Anteils der CD11c⁺-Zellen (Mock: 76,64 %, Adeqfp: 81,06 %) zeigte jedoch, daß die Infektion der Zellen mit Adeqfp keinen signifikanten Effekt auf den Anteil der CD11c⁺-Zellen hatte, sondern lediglich auf die MHC II-Expression. Die Ursache hierfür ist unbekannt. Es könnte sich sowohl um einen direkten Effekt der Infektion mit dem Virus als auch um einen indirekten Effekt, z.B. durch eine toxisch wirkende Substanz in dem Adenovirusstock, handeln. Da ein solcher Effekt der Infektion auf die MHC II-Expression der dendritischen Zellen bislang nicht beschrieben wurde, erscheint die Möglichkeit einer toxisch wirkenden Kontamination in dem Adenovirusstock als wahrscheinlicher.

Mit dem hier etablierten Standardprotokoll (sechs Tage Kultivierung) wurden Ausbeuten von $3,5\text{-}4 \times 10^6$ dendritische Zellen (CD11c⁺/MHC II⁺) pro Maus erzielt. Die Infektion mit adenoviralen Vektoren hatte keinen Einfluß auf die Ausbeute.

Die bisherigen Ergebnisse zur Generierung von murinen dendritischen Zellen aus Knochenmarksvorläuferzellen und deren Infektion mit adenoviralen Vektoren haben

gezeigt, daß mit der angewendeten Kultivierungsmethode in Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 dendritische Zellen generiert werden konnten. Mit zunehmender Kultivierungsdauer erhöht sich der Anteil an dendritischen Zellen von etwa 45-50 % am Tag 6 auf etwa 75-80 % am Tag 10 und damit der Anteil an reifen MHC II⁺ dendritischen Zellen. Durch die Verwendung von Adegfp konnte gezeigt werden, daß bei einer MOI von 100 \geq 50 % der dendritischen Zellen infiziert wurden. Die Expression des Transgens war dabei bereits zwei Tage nach der Infektion nachweisbar und blieb es mindestens für 6 Tage nach der Infektion.

3.3.2 Expression der HPV-16 Sequenzen in infizierten dendritischen Zellen

Nachdem die Infizierbarkeit der dendritischen Zellen gezeigt wurde, sollte der Nachweis des effizienten Gentransfers mit den für die Immuntherapie hergestellten Viren erbracht werden. Für den Nachweis der Expression der HPV-16 Sequenzen in dendritischen Zellen wurden dendritische Zellen mit den rekombinanten Adenoviren, die HPV-16 Sequenzen codieren, infiziert. Immunozytochemische Färbungen wurden benutzt, um die Expression der HPV-16 Proteine und Fusionsproteine nachzuweisen.

3.3.2.1 Infektion muriner dendritischer Zellen und Expressionsnachweis der HPV-16 Sequenzen

Der Nachweis der Expression der HPV-16 Sequenzen in den infizierten murinen dendritischen Zellen erfolgte durch immunozytochemische Färbungen. Diese Färbungen mit dem universellen Immunostainingsystem (Immunotech) wurden wie unter 3.1.4.2 beschrieben durchgeführt. Für die L1- und E7-spezifischen Färbungen wurden murine dendritische Zellen aus Knochenmarksvorläuferzellen gewonnen, am Tag 4 nach der Isolation mit den entsprechenden adenoviralen Vektoren (MOI 100) infiziert. Nach weiteren zwei Tagen in Kultur wurden die Zellen für die immunozytochemischen Färbungen fixiert. Als Kontrollen dienten Mock-infizierte und AdE7-infizierte Zellen für den L1-spezifischen Nachweis bzw. Adegfp-infizierte Zellen für den E7-spezifischen Nachweis. Zusätzlich wurde die MHC II-Expression durch immunozytochemische Färbungen nachgewiesen, um die dendritischen Zellen zu identifizieren.

Die mikroskopische Betrachtung der L1-spezifischen Färbungen (Abb. 3.18 A) zeigte eine eindeutige Expression der HPV-16 L1-Proteine und L1/E7-Fusionsproteine in den murinen dendritischen Zellen, die zuvor mit AdL1p, AdL1 Δ p, AdL1p/E7₁₋₆₀ oder AdL1p/E7 infiziert wurden. Die Intensität dieser Färbungen war deutlich von den schwachen Färbungen der Kontrollen zu unterscheiden, so daß eine unspezifische Wechselwirkung der verwendeten Agenzien mit den Zellen ausgeschlossen werden kann. Die positiven Zellen der MHC II-spezifischen Färbung (Abb. 3.18 B) mit den deutlich erkennbaren Zellausläufern bestätigten die charakteristische Morphologie der dendritischen Zellen (siehe 1.3), und der Vergleich mit den L1-spezifischen Färbungen zeigt, daß die L1-Expression bevorzugt in den MHC II⁺-Zelltypen mit den charakteristischen Zellausläufern dendritischer Zellen erfolgte.

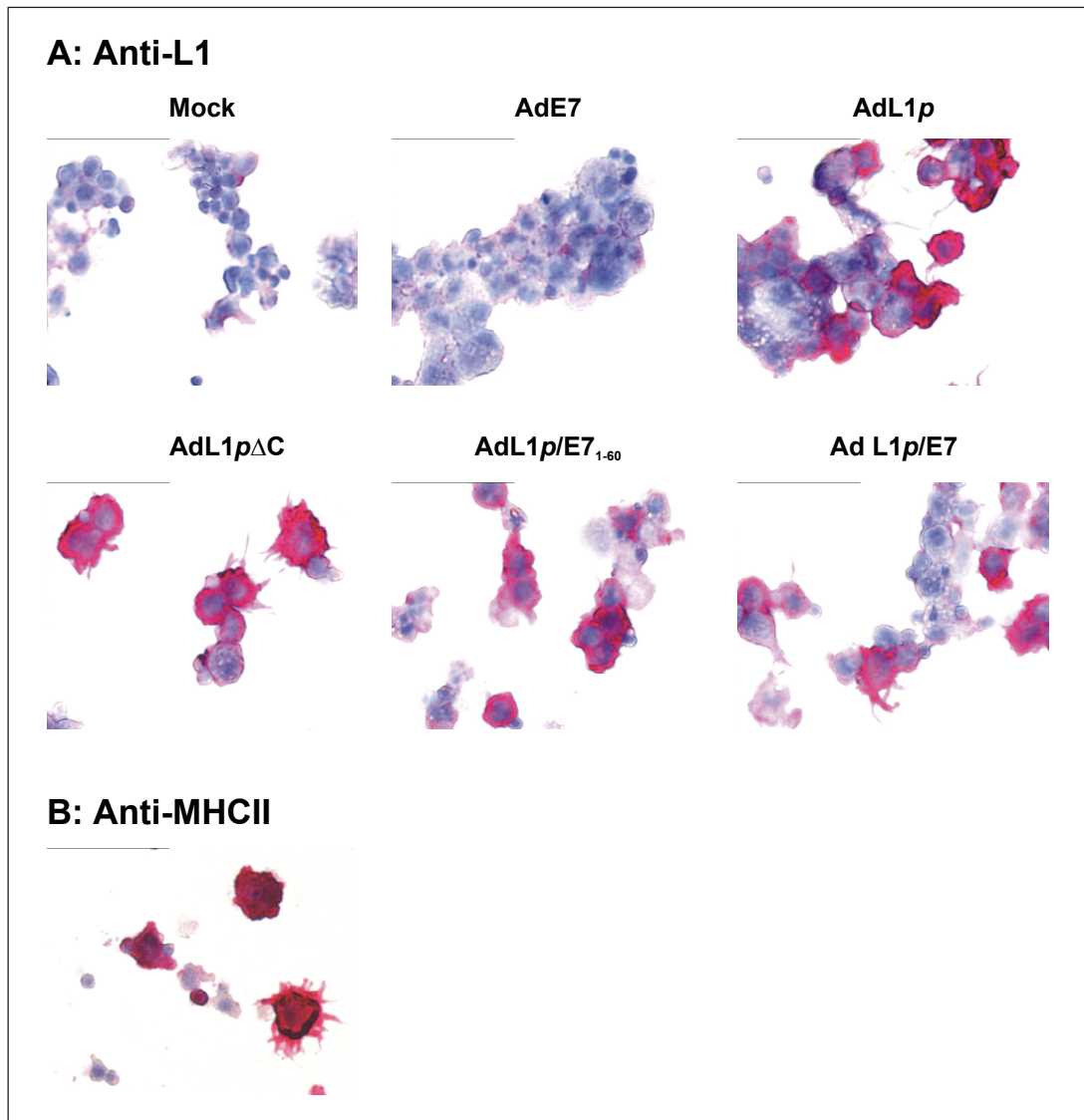


Abb. 3.18: Expression von HPV-16 L1 und L1/E7 in infizierten murinen dendritischen Zellen. Aus dem Knochenmark gewonnene dendritische Zellen wurden mit den angegebenen adenoviralen Vektoren (Pflanzenoptimierte Codons für L1) am Tag 4 infiziert und für zwei Tage weiterkultiviert. Für den indirekten Nachweis am Tag 6 wurde entweder ein L1-spezifischer (A) oder ein MHC II-spezifischer (B) primärer Antikörper eingesetzt. Die Visualisierung des sekundären Antikörpers erfolgte mit dem universellen Immunostainingsystem von Immunotech. Aufnahmen mit 400-facher Vergrößerung.

Analog zum L1-Nachweis sollte auch der Nachweis von E7 nach Infektion von dendritischen Zellen mit den adenoviralen Vektoren erfolgen. Dafür wurde der E7-spezifische Antikörper für die immunozytochemischen Färbungen verwendet. Die Färbungen für den Expressionsnachweis von HPV-16 E7 bzw. den E7-Teil der L1/E7-Fusionsproteine (Abb. 3.19 A) zeigten jedoch weder in den AdE7-infizierten dendritischen Zellen noch in den AdL1p/E7₁₋₆₀- oder AdL1p/E7-infizierten Zellen eine ganz eindeutige E7-Expression.

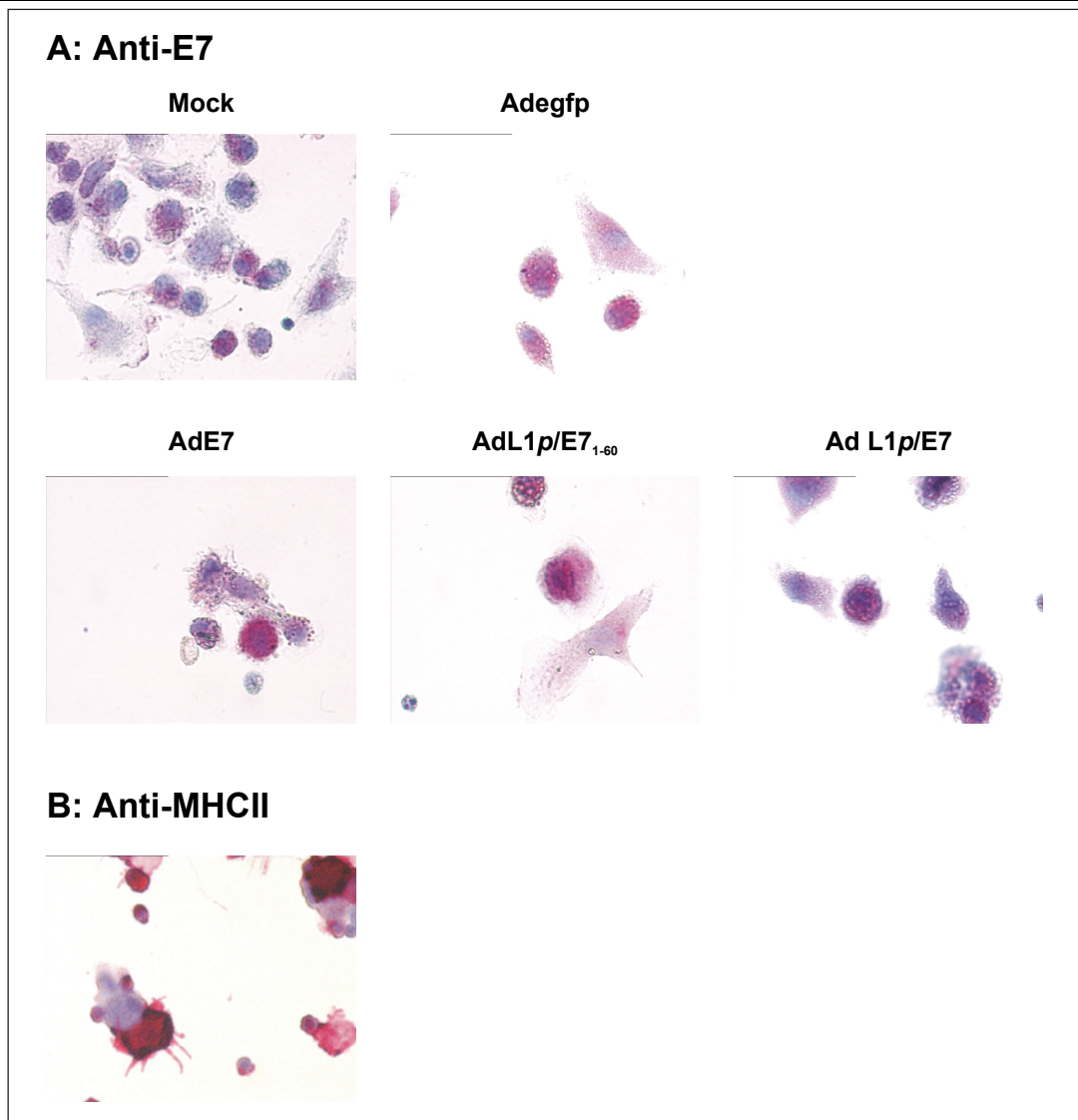


Abb. 3.19: HPV-16 E7-Expression in infizierten murinen dendritischen Zellen. Dendritische Zellen wurden durch die Kultivierung von Knochenmarksvorläuferzellen gewonnen. Die Infektion mit den angegebenen adenoviralen Vektoren (Pflanzenoptimierte Codons für L1) erfolgte am Tag 4 nach der Isolation. Für den indirekten Nachweis am Tag 6 wurde entweder ein E7-spezifischer (A) oder ein MHC II-spezifischer (B) primärer Antikörper eingesetzt, bevor die Visualisierung mit dem universellen Immunostainingsystem (Immunotech) erfolgte. 400-fache Vergrößerung.

Da die Expression von E7 und L1/E7 nach Infektion mit den adenoviralen Vektoren bereits zuvor in A549 Zellen gezeigt worden war (siehe Abb. 3.7) und die Expression des L1-Teils der L1/E7-Fusionsproteine auch in murinen dendritischen Zellen nachgewiesen werden konnte (siehe oben), war dieses Ergebnis unerwartet. Vermutlich wurde die mangelnde Sensitivität der Färbungen durch den verwendeten E7-spezifischen primären Antikörper in Kombination mit niedrigerer Expression in murinen dendritischen Zellen verursacht, da die parallel durchgeführte MHC II-spezifische Färbung (Abb. 3.19 B) eindeutig positiv war. Aber auch andere Ursachen für die Probleme beim Nachweis der E7-Expression können nicht ausgeschlossen werden. Da z.B. die Expressionsstärke in murinen dendritischen Zellen im Vergleich zu anderen Zellen reduziert zu sein scheint¹⁵⁹, könnte durch reduzierte Expression von E7 die Proteinmenge unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Da die Expression der L1/E7-Fusionsproteine in den infizierten dendritischen Zellen nachgewiesen

werden konnte, scheint eher die niedrigere Sensitivität des E7-spezifischen Antikörpers verantwortlich zu sein. Auch der Vergleich der Sensitivität der beiden Nachweisreaktionen in infizierten A549 Zellen (Abb. 3.6 bzw. Abb. 3.7) deutet darauf hin, daß die E7-spezifischen Färbungen eine geringere Sensitivität besitzt als die L1-spezifischen.

3.3.2.2 Infektion humaner dendritischer Zellen und immunozytochemischer Nachweis der Expression der HPV-16 Sequenzen

Um die Möglichkeit des Einsatzes der Vektoren, die relevante HPV-16 Sequenzen codieren, im Rahmen einer Immuntherapie mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen im Menschen zu untersuchen, sollte auch die Infizierbarkeit humaner dendritischer Zellen und die Expression der HPV-16 Sequenzen nachgewiesen werden.

Für diese Untersuchung wurde das in der Arbeitsgruppe etablierte Protokoll zur Generierung humaner dendritischer Zellen verwendet. Die Vorläuferzellen humaner dendritischer Zellen wurden aus dem peripheren Blut isoliert, über einen Ficoll-Dichtegradienten aufgereinigt und die gewonnenen Monozyten in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 kultiviert. Durch die Zugabe der Zytokine wurde die Differenzierung der Monozyten in dendritische Zellen induziert. Mit diesem Protokoll werden standardmäßig <80 % dendritische Zellen generiert (persönl. Mitteilung von K. Dittmar, GBF). Wie für die murinen dendritischen Zellen beschrieben, wurden die Zellen am Tag 4 nach der Isolation mit den entsprechenden adenoviralen Vektoren (MOI 100) infiziert. Zwei Tage nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und die Expression der HPV-16 Sequenzen immunozytochemisch nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde die MHC II-Expression der dendritischen Zellen mit immunozytochemische Färbungen gezeigt.

Die L1-spezifischen Färbungen von infizierten humanen dendritischen Zellen wiesen eine eindeutige Expression in Zellen auf, die mit AdL1p, AdL1Δp, AdL1p/E7₁₋₆₀ oder AdL1p/E7 infiziert waren (Abb. 3.20 A). Die Intensität der Färbung dieser Präparate zeigt ein L1-spezifisches Signal, da die Färbungen der Mock- oder der AdE7-infizierten Zellen nur eine sehr schwache Hintergrundfärbung zeigten. Ein Vergleich der Morphologie der L1-exprimierenden Zellen mit der MHC II-spezifischen Färbung (Abb. 3.20 B), die zur Kontrolle für die dendritischen Zellen diente, zeigte, daß die Expression der L1-Sequenzen bevorzugt in den MHC II⁺-Zelltypen mit den charakteristischen Zellausläufern dendritischer Zellen erfolgte.

Die mikroskopische Auswertung der immunozytochemischen Färbung infizierter humaner dendritischer Zellen mit dem E7-spezifischen Antikörper (Abb. 3.21 A) zeigte eindeutig die Expression von E7 bzw. das Vorhandensein des E7-Teils in den L1/E7-Fusionsproteinen nach Infektion der Zellen mit AdL1p/E7₁₋₆₀ oder AdL1p/E7. Die Intensität dieser Färbungen unterschied sich deutlich von den Kontrollfärbungen der Mock- oder AdL1p-infizierten Zellen. Dagegen konnte die E7-Expression nach Infektion mit AdE7 nicht so eindeutig nachgewiesen werden, da sich die Verteilung des Substratpräzipitates und die Intensität nicht deutlich von den Mock infizierten Zellen unterschieden. Sie war jedoch positiv gegenüber der Kontrollfärbung nach Infektion mit dem irrelevanten Adenovirus AdL1p. Die geringere Intensität gegenüber den L1/E7-Fusionsproteinen könnte auf die kurze Halbwertszeit von E7 in Zellen³⁰² sowie die Verwendung einer gegenüber dem Wildtyp-Protein instabileren E7-Variante²⁹¹ zurückzuführen sein. Aber auch die spezielle

Antigenprozessierungsmaschinerie der dendritischen Zellen könnte zu einer effizienten Proteindegradation und damit reduzierten Expression im Vergleich zu A549 Zellen führen. Die Ergebnisse der MHC II-spezifischen Färbung (Abb. 3.21 B) zeigten, daß die nach der Infektion mit AdL1p/E7₁₋₆₀ oder AdL1p/E7 positiven Zellen für E7 in ihrer Morphologie mit den MHC II⁺-Zellen übereinstimmten.

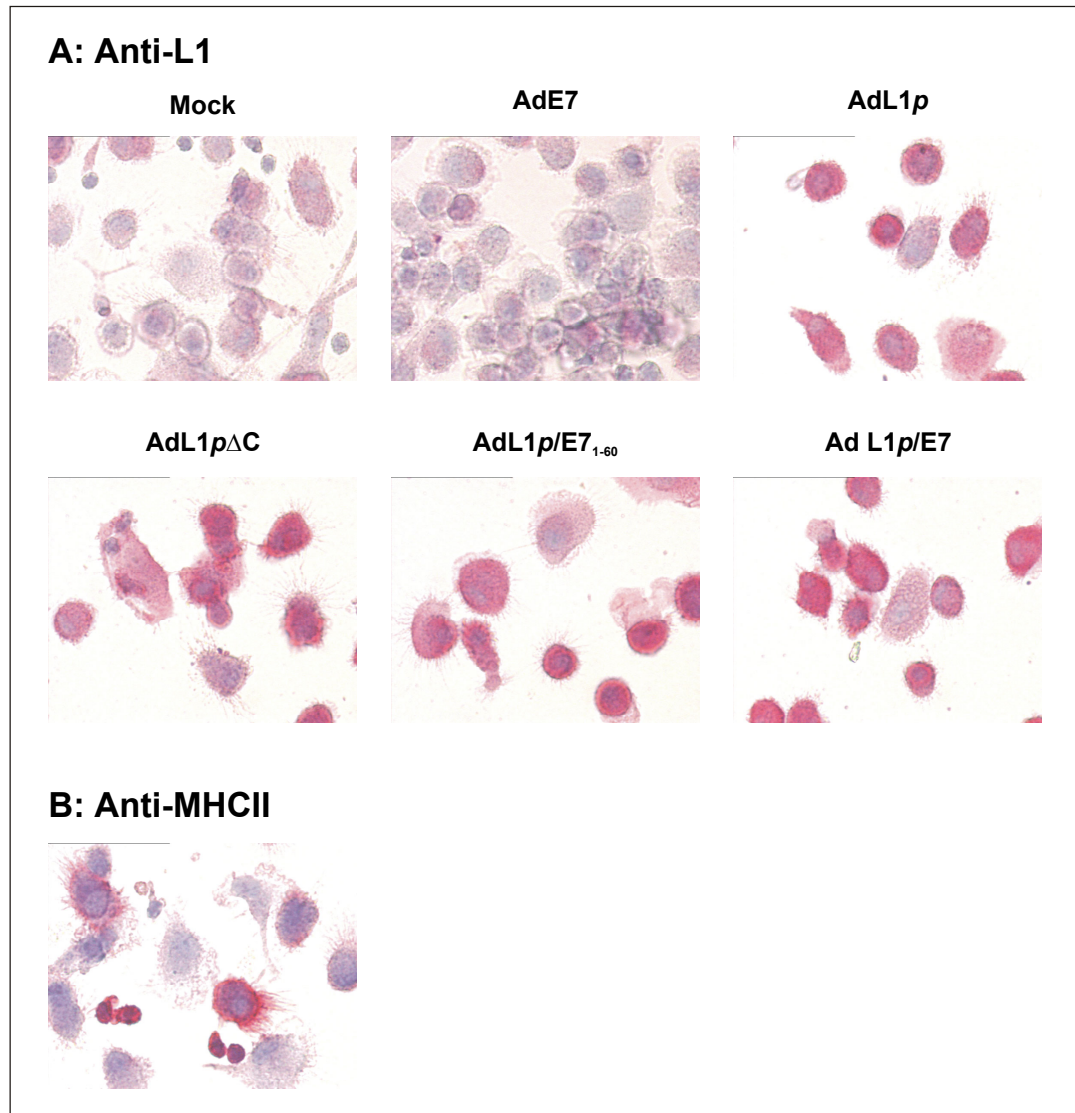


Abb. 3.20: HPV-16 L1-Expression in infizierten humanen dendritischen Zellen. Dendritische Zellen wurden durch die Kultivierung von isolierten Monozyten in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 gewonnen. Am Tag 4 nach der Isolation wurden die Zellen mit den angegebenen Adenoviren (Pflanzenoptimierte Codons für L1) infiziert. Für den indirekten Nachweis wurde entweder ein L1-spezifischer (A) oder ein MHC II-spezifischer (B) primärer Antikörper eingesetzt und mit dem universellen Immunostainingsystem (Immunotech) detektiert. 400-fache Vergrößerung.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Infektion der dendritischen Zellen mit den rekombinanten Adenoviren, die therapeutisch anwendbare HPV-16 Sequenzen codieren, haben gezeigt, daß sowohl murine als auch humane dendritische Zellen effizient mit diesen Vektoren infiziert werden können. Die Expression der HPV-16 Sequenzen konnte in den infizierten murinen und humanen dendritischen Zellen nachgewiesen werden. In ihrer Morphologie stimmten die infizierten und HPV-16 Sequenzen-exprimierenden Zellen mit

der von MHC II⁺-Zelltypen mit den für dendritischen Zellen charakteristischen Zellfortsätzen überein.

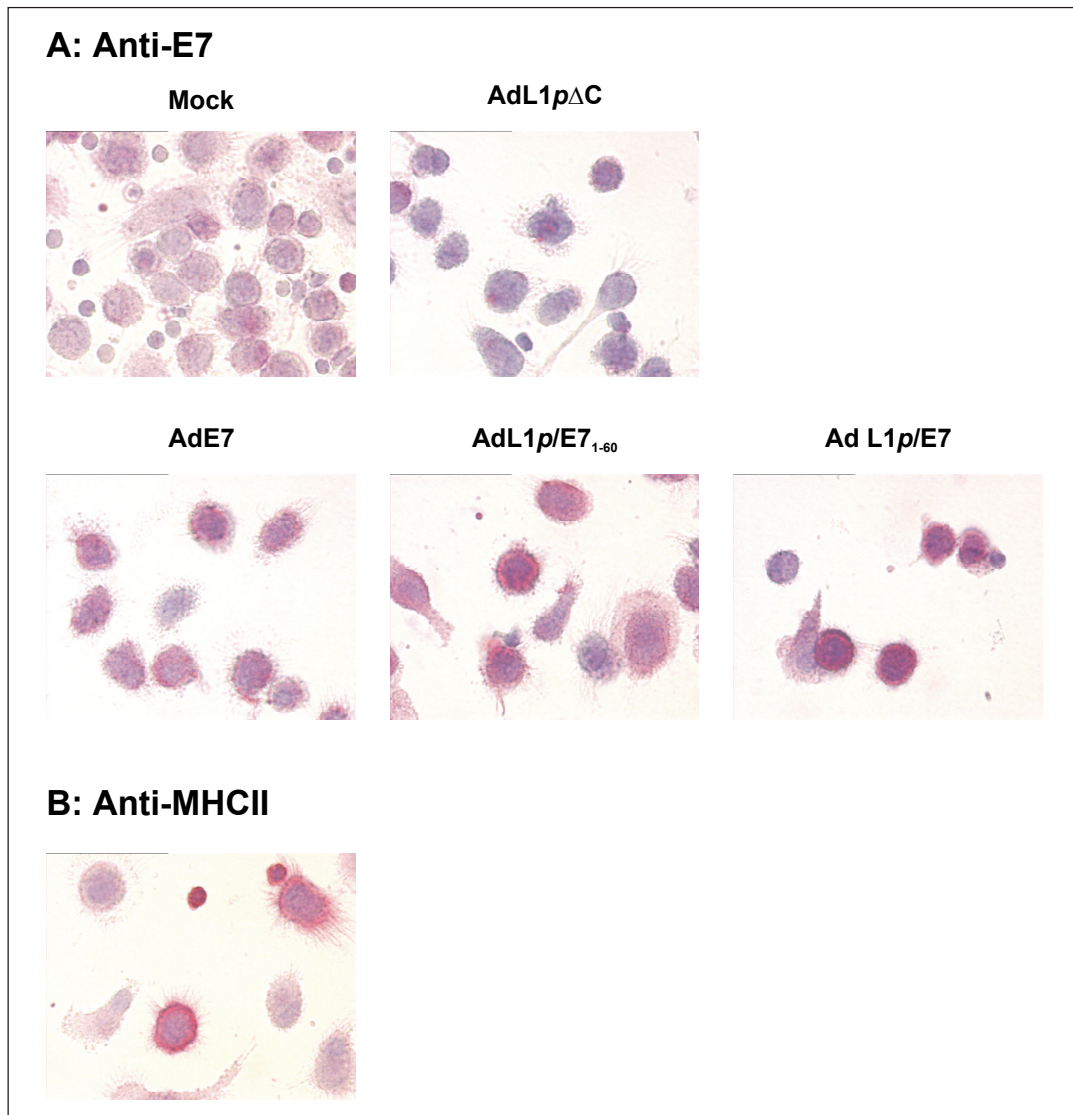


Abb. 3.21: HPV-16 E7-Expression in infizierten humanen dendritischen Zellen. Dendritische Zellen wurden durch die Kultivierung von isolierten Monozyten in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 gewonnen. Am Tag 4 nach der Isolation wurden die Zellen mit den angegebenen Adenoviren (Pflanzenoptimierte Codons für L1) infiziert. Für den indirekten Nachweis wurde entweder ein E7-spezifischer (A) oder ein MHC II-spezifischer (B) primärer Antikörper eingesetzt und mit dem universellen Immunostainingsystem (Immunotech) nachgewiesen. Aufnahmen mit 400-facher Vergrößerung.

3.3.3 Effekt der kostimulatorischen Moleküle auf die Ausreifung der dendritischen Zellen

Zusätzlich zum Expressionsnachweis der kostimulatorischen Moleküle in infizierten A549 Zellen sollte der Einfluß dieser Proteine auf den Differenzierungszustand der dendritische Zellen untersucht werden. Wegen des restringierten und vom Aktivierungszustand der Zellen abhängigen Expressionsprofils in dendritischen Zellen und Lymphozyten wurde bereits sehr früh postuliert, daß die Rezeptor/Ligandenpaare der TNF- und TNFR-Superfamilien für die Interaktion von dendritischen Zellen und T-Lymphozyten zur Initiation einer Immunantwort von Bedeutung sind (siehe 1.4). Insbesondere für

CD40/CD40L konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, daß die Aktivierung von CD40 auf dendritischen Zellen zu einer Zunahme ihres Differenzierungszustands führt^{189,190}. Durch die Modifikation des Differenzierungsgrads wird die Expression von Oberflächenproteinen, wie den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 und anderer mit der Ausreifung der dendritischen Zellen assoziierter Proteine, erhöht. Durch die Zunahme der Expression von CD80 und CD86, aber auch durch andere Mechanismen wie z.B. die Sekretion von Zytokinen, wird gleichzeitig die immunstimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen zur Aktivierung von T-Lymphozyten verbessert. Aus diesem Grund dienen CD80 und CD86 häufig auch zur Charakterisierung der stimulatorischen Kapazität der dendritischen Zellen. Somit sollte untersucht werden, ob auch durch den adenoviralen Gentransfer der kostimulatorischen TNF- bzw. TNFR-Moleküle der Differenzierungsgrad verbessert werden könnte. Eine solche Verstärkung des immunstimulatorischen Potentials ist besonders für die optimale Nutzung von dendritischen Zellen im Rahmen einer Immuntherapie von großem Interesse.

Für diese Untersuchung wurden murine dendritische Zellen aus Knochenmarkszellen in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 gewonnen. Am Tag 4 nach der Isolation erfolgte die Infektion der Zellen mit den entsprechenden rekombinanten Adenoviren. Aufgrund der Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten für die Infektion der Zellen mit den adenoviralen Vektoren wurden die verschiedenen Vektoren in Gruppen unterteilt (siehe Tab. 3.5). So wurden falls vorhanden Rezeptor/Ligandenpaare (d.h. AdCD40+AdCD40L bzw. AdRANK+AdRANKL) kombiniert. Da die rekombinanten Adenoviren für 4-1BB nicht generiert werden konnten (siehe 3.2.2.1), unreife dendritische Zellen jedoch 4-1BB exprimieren^{214,215}, wurde 4-1BBL alleine untersucht. Anschließend wurden die Rezeptor/Ligandenpaare nach ihrem Expressionsmuster unterteilt, d.h. die endogen in T-Zellen exprimierten (AdCD40L+AdRANKL) bzw. endogen in dendritischen Zellen exprimierten kostimulatorischen Moleküle (AdCD40+AdRANK) wurden zusammengefaßt. Um einen synergistischen Effekt der kostimulatorischen Moleküle zu analysieren, wurden die Zellen mit allen Vektoren bzw. mit AdRANK+AdRANK+Ad4-1BBL koinfiziert. Für die Infektionen wurde für jeden Vektor eine MOI von 100 eingesetzt. Am Tag 6 wurde der Einfluß der kostimulatorischen Moleküle auf die Expression der Oberflächenproteinen CD11c, MHC II, CD80 und CD86 im FACS analysiert.

Die Ergebnisse der FACS-Untersuchungen der dendritischen Zellen sind in Tab. 3.5 zusammengefaßt.

Die Infektion der Zellen mit AdeGfp führte zu der bereits beobachtete Abnahme der MHC II-Expression von 68,58 % (Mock) auf 53,58 % (AdeGfp) (Abb. 3.22). Der Vergleich der Expression von CD80 und CD86 zeigte keine eindeutige Veränderung für CD80 (Mock: 30,78 %, AdeGfp: 32,58 %) und CD86 (Mock: 60,41 %, AdeGfp: 56,67 %). Wegen der unveränderten Expression von CD80 und CD86 wurde die Infektion der dendritischen Zellen mit den rekombinanten Adenoviren als ein neutrales Ereignis interpretiert. Das steht im Einklang mit der Beobachtung anderer Arbeitsgruppen. In der Literatur wird die Infektion dendritischer Zellen mit adenoviralen Vektoren als ein neutrales³⁰³ oder leicht aktivierendes Signal³⁰⁴ beschrieben.

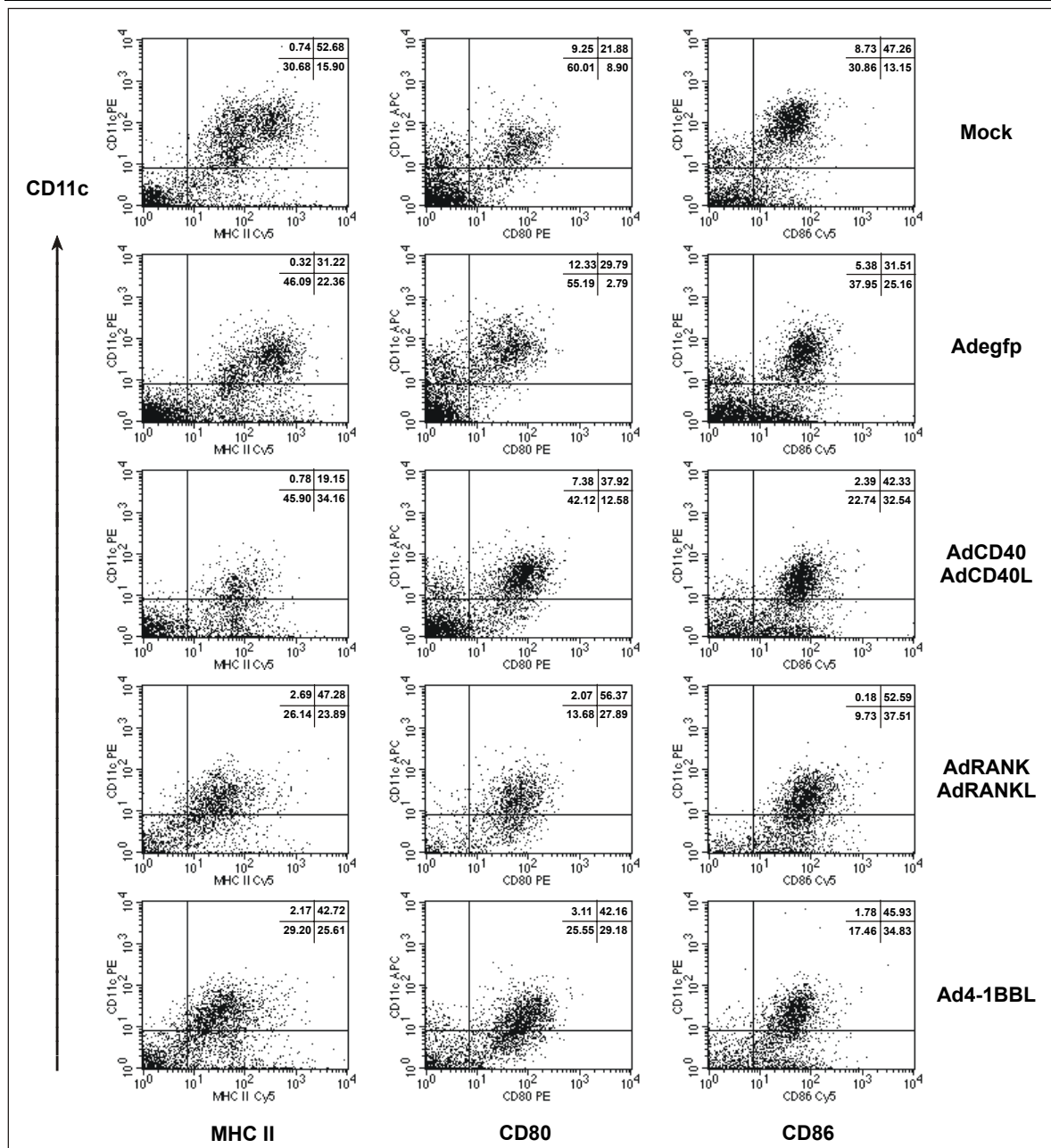


Abb. 3.22: Effekt des adenoviralen Gentransfers von kostimulatorischen Moleküle auf murine dendritische Zellen. Die dendritischen Zellen wurden aus den Knochenmarksvorläuferzellen gewonnen und in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 kultiviert. Am Tag 4 erfolgte die Infektion mit den angegebenen adenoviralen Vektoren (jeweils MOI 100). Am Tag 6 wurden die Zellen mit den Antikörpern spezifisch für CD11c, MHC II, CD80 oder CD86 (siehe Tab. 2.5) markiert und die Expression dieser Oberflächenproteine im FACS analysiert. Die Einstellung des PE-Kanals für CD11c und des Cy5-Kanals für MHC II bzw. CD86 hat sich während der Messung verschoben.

Durch den adenoviralen Gentransfer von CD40 und CD40L wurde eine Zunahme des Differenzierungsgrads der Zellen sowie der Expression von CD80 und CD86 erwartet^{189,190}. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten die mit AdCD40+AdCD40L infizierten Zellen (Abb. 3.22) ebenfalls eine Reduktion der MHC II-Expression auf 53,31 %, die vergleichbar war mit der nach Infektion mit Adegfp (53,58 %). Dagegen konnte für CD80 eine Zunahme der positiven Zellen von 30,78 % (Mock) auf 50,5 % beobachtet werden. Die Expressionsintensität von CD86 durch den Transfer von CD40 und CD40L stieg von 56,67 % (Adegfp) auf 74,87 %. Die Ergebnisse für CD80 und CD86 bestätigten die

Erwartungen, jedoch wurde für MHC II und damit für den Differenzierungsgrad der Zellen ein deutlicherer Effekt von CD40/CD40L erwartet wurde.

Durch die Infektion der Zellen mit AdRANK+AdRANKL wurde keine Veränderung der Expression von CD80 und CD86 erwartet, da das Expressionsniveau dieser beiden Moleküle nach Aktivierung von dendritischen Zellen mit RANKL unverändert blieb¹⁹⁷. Durch den anti-apoptotischen Effekt von RANKL wird das stimulatorische Potential der dendritischen Zellen jedoch erhöht^{197,204}, so daß durch das längere Überleben der Differenzierungsgrad der dendritischen Zellpopulation gesteigert werden könnte. Durch den adenoviralen Gentransfer von RANK und RANKL konnte ein deutlicher Effekt auf die Expression der Oberflächenproteine nachgewiesen werden (Abb. 3.22). So nahm die Zahl von MHC II⁺-Zellen von 53,58 % (Adeqfp) auf 71,17 % zu und erreichte wieder das Niveau der Mock-infizierten Zellen. Für CD80 wurde eine deutliche Zunahme von 30,78 % (Mock) bzw. 32,58 % (Adeqfp) auf 84,26 % nachgewiesen werden. Ein deutlicher Anstieg konnte auch für CD86 von 60,41 % (Mock) bzw. 56,67 % (Adeqfp) auf 90,10 % beobachtet werden. Die Zunahme der Expression von CD80 und CD86 nach der Infektion mit AdRANK+AdRANKL war unerwartet. Diese Zunahmen könnten jedoch, wie die gesteigerte MHC II-Expression, auf den anti-apoptotischen Effekt von RANKL zurückzuführen sein, da auch die reifen dendritischen Zellen, die CD80 und CD86 hoch exprimieren, länger überleben.

Für die Infektion der dendritischen Zelle mit Ad4-1BBL wurde ein ähnlicher Effekt wie für CD40/CD40L erwartet, da unreife dendritischen Zellen 4-1BB exprimieren und die 4-1BB-Aktiveringung zur Ausreifung der Zellen führt, wodurch auch die Expression von CD80 und CD86 erhöht wird^{214,215}, so daß auch ohne den adenoviralen Transfer von 4-1BB ein Effekt durch die Expression von 4-1BBL erwartet wurde. Wie AdRANK+AdRANKL hatte die Infektion mit Ad4-1BBL einen deutlichen Effekt auf die Expression der untersuchten Oberflächenproteine. So stieg die MHC II-Expression auf 68,33 %, einem Wert deutlich höher als nach Infektion mit Adeqfp (53,58 %) und vergleichbar zur Mock-Kontrolle (68,52 %). Die Anzahl der CD80⁺-Zellen nahm auf 71,34 % und die der CD86⁺-Zellen auf 80,76 % zu. Der Effekt von 4-1BBL war etwas schwächer als mit RANK und RANKL. Dies könnte darauf beruhen, daß die endogene Expression des Rezeptors (4-1BB) nicht wie im Falle von RANK erhöht wurde. Die Expression von 4-1BB wurde in den dendritischen Zellen im FACS untersucht, konnte jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Dies war unerwartet, da der gleiche 4-1BB-spezifische Antikörper wie von Futagawa et al.²¹⁴ verwendet wurde. Außerdem konnte nach dem Transfer von 4-1BBL eine Zunahme der typischen Zellaggregate, die charakteristisch für dendritische Zellkulturen sind, beobachtet werden, was auf eine Expression von 4-1BB deutet. Wegen dieser Beobachtung und der 4-1BBL-Ergebnisse im FACS scheint die nicht nachweisbare 4-1BB-Expression eher auf ein technisches Problem zurückzugehen, als auf die fehlende Expression von 4-1BB.

Tab. 3.5: Zusammenfassung der FACS-Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses der kostimulatorischen Moleküle auf murine dendritische Zellkulturen.

adenoviraler Gentransfer von	relativer Anteil an positiven Zellen [%]		
	MHC II	CD80	CD86
Mock	68,58 (CD11c ⁺ : 52,68)	30,78 (CD11c ⁺ : 21,88)	60,41 (CD11c ⁺ : 47,26)
EGFP	53,58 (CD11c ⁺ : 31,22)	32,58 (CD11c ⁺ : 29,79)	56,67 (CD11c ⁺ : 31,51)
CD40+CD40L	53,31 (CD11c ⁺ : 19,15)	50,50 (CD11c ⁺ : 37,92)	74,87 (CD11c ⁺ : 42,33)
RANK+RANKL	71,17 (CD11c ⁺ : 47,28)	84,26 (CD11c ⁺ : 56,37)	90,10 (CD11c ⁺ : 52,59)
4-1BBL	68,33 (CD11c ⁺ : 42,72)	71,34 (CD11c ⁺ : 42,16)	80,76 (CD11c ⁺ : 45,93)
CD40+RANK	56,88 (CD11c ⁺ : 34,24)	46,79 (CD11c ⁺ : 33,09)	69,05 (CD11c ⁺ : 28,67)
CD40L+RANKL	64,69 (CD11c ⁺ : 52,94)	79,52 (CD11c ⁺ : 48,19)	84,17 (CD11c ⁺ : 46,52)
CD40+CD40L+RANK+RANKL	64,35 (CD11c ⁺ : 42,24)	87,33 (CD11c ⁺ : 46,82)	85,40 (CD11c ⁺ : 47,27)
RANK+RANKL+4-1BBL	82,43 (CD11c ⁺ : 68,25)	93,08 (CD11c ⁺ : 69,87)	94,73 (CD11c ⁺ : 70,59)

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, daß die Infektion der dendritischen Zellen mit adenoviralen Vektoren, die kostimulatorische Moleküle codieren, die Expression der Oberflächenproteine MHC II, CD80 und CD86 verstärkt (siehe Tab. 3.5). Das Rezeptor/Ligandenpaar CD40/CD40L induzierte den geringsten Effekt, wohingegen RANK/RANKL den deutlichsten Effekt zeigten. Durch den adenovirale Gentransfer von 4-1BBL wurde die Expression von MHC II, CD80 und CD86 auch eindeutig verstärkt. Die Infektion der dendritischen Zellen mit Adenovirus (Adegfp) zeigte keine Erhöhung. Es fiel auf, daß in den Gruppen mit einer phänotypischen Veränderung der Zellen durch die Expression der kostimulatorischen Moleküle der Anteil an doppelnegativen Zellen im unteren linken Quadrant der FACS-Diagramme im Vergleich zu den Kontrollen deutlich abnahm. Diese Abnahmen der kontaminierenden Zellen wurde bereits in den Ansätzen beobachtet, in denen die dendritischen Zellkulturen für einen längeren Zeitraum kultiviert wurden (Abb. 3.17) und als Zunahme der Homogenität gedeutet. Somit scheint durch die kostimulatorischen Moleküle die Kultivierungsdauer zur Gewinnung einer homogenen und reiferen Population von dendritischen Zellen verkürzt zu sein.

Die Aufteilung der Rezeptor/Ligandenpaare CD40/CD40L und RANK/RANKL nach ihrem Expressionsmuster sollte dazu dienen, die Frage näher zu untersuchen, ob die endogene Expression von CD40 und RANK in dendritischen Zellen für den beobachteten

Effekt der Rezeptor/Ligandenpaare von Bedeutung war. Theoretisch könnte durch den adenoviralen Transfer von CD40L und RANKL, die endogen in T-Zellen exprimiert werden, eine Aktivierung der dendritischen Zellen durch die endogen exprimierten Rezeptoren erfolgen. Die Ergebnisse in Abb. 3.23 zeigen die Auswirkungen der Aufteilung der Rezeptor/Ligandenpaare auf die Expression von MHC II, CD80 und CD86. Die Koinfektion der dendritischen Zellen mit AdCD40+AdRANK führte dabei zu einer deutlich schwächeren Zunahme der gemessenen Oberflächenproteine als mit den Liganden AdCD40L+AdRANKL. Im Vergleich zu den Kontrollen in Abb. 3.22 wurde mit AdCD40+RANK zwar ein leichter Anstieg der CD80⁺-Zellen von 32,58 % (Adeqfp) auf 46,79 % und der CD86⁺-Zellen von 60,41 % (Mock) auf 69,05 % nachgewiesen. Allerdings konnte die bereits erwähnte Abnahme der MHC II-Expression nach der Infektion mit Adenovirus mit 56,88 % nicht kompensiert werden. Dagegen konnte durch die Infektion mit AdCD40L+ AdRANKL die Abnahme der MHC II-Expression mit 64,69 % so gut wie kompensiert werden. Auch die Zunahme für CD80 und CD86 mit 79,52 % bzw. 84,17 % war deutlicher als mit AdCD40L+AdRANKL. Der Anteil der kontaminierenden doppelnegativen Zellen im unteren linken Quadranten zeigte keine Abnahme mit AdCD40+AdRANK, allerdings nach Infektion mit AdCD40L+AdRANKL.

Der Vergleich der phänotypischen Veränderung nach der Koinfektion mit AdCD40+AdRANK bzw. AdCD40L+AdRANKL (Abb. 3.23) mit denen der Rezeptor und Liganden codierenden Vektoren (Abb. 3.22) zeigte, daß die Steigerung der endogenen Expression der an sich schon in dendritischen Zellen vorkommenden kostimulatorischen Moleküle (CD40,RANK) durch Infektion mit den entsprechenden Konstrukten zu einer weiteren Aktivierung der dendritischen Zellen durch die Liganden führte. Obwohl es nicht direkt untersucht wurde, scheinen AdCD40 in Kombination mit AdRANK bzw. AdCD40L im Kombination mit AdRANKL wie zuvor zusammen keinen Effekt auf die Expression der untersuchten Oberflächenproteine gehabt zu haben. Vermutlich kann die beobachtete phänotypische Veränderung auf RANK und RANKL alleine zurückgeführt werden. Jedoch kann ein Effekt von CD40 und CD40L auf andere Oberflächenmoleküle oder auf die Produktion von Zytokinen, die zu einer Steigerung des immunstimulatorischen Potentials der dendritischen Zellen führen, nicht ausgeschlossen werden.

Um mögliche synergistische Effekte der kostimulatorische Moleküle auf die Expression von MHC II, CD80 und CD86 zu untersuchen, wurden die dendritischen Zellen mit allen Vektoren, die kostimulatorische Moleküle codieren, oder mit AdRANK+AdRANK+Ad4-1BBL koinfiziert. Die Koinfektion der dendritischen Zellen mit allen kostimulatorischen Vektoren (AdCD40+AdCD40L+AdRANK+AdRANKL+Ad4-1BBL) führte zu einer Erhöhung der Expressionsintensitäten der untersuchten Oberflächenproteine im Vergleich zu Adeqfp-infizierten Zellen (Abb. 3.22), jedoch unterschied sich der Effekt nicht wesentlich von dem der Koinfektion mit AdRANK+AdRANKL. So stieg die CD80-Expression von 32,58 % (Adeqfp) auf 87,33 %. Der Anteil der CD86⁺-Zellen nahm von 56,67 % (Adeqfp) auf 85,40 % zu. Die MHC II-Expressionsintensität erreichte mit 64,35 % wieder den Wert der Mock-infizierten Zellen (68,52 %). Auch der relative Anteil der kontaminierenden doppelnegativen Zellen nahm deutlich ab.

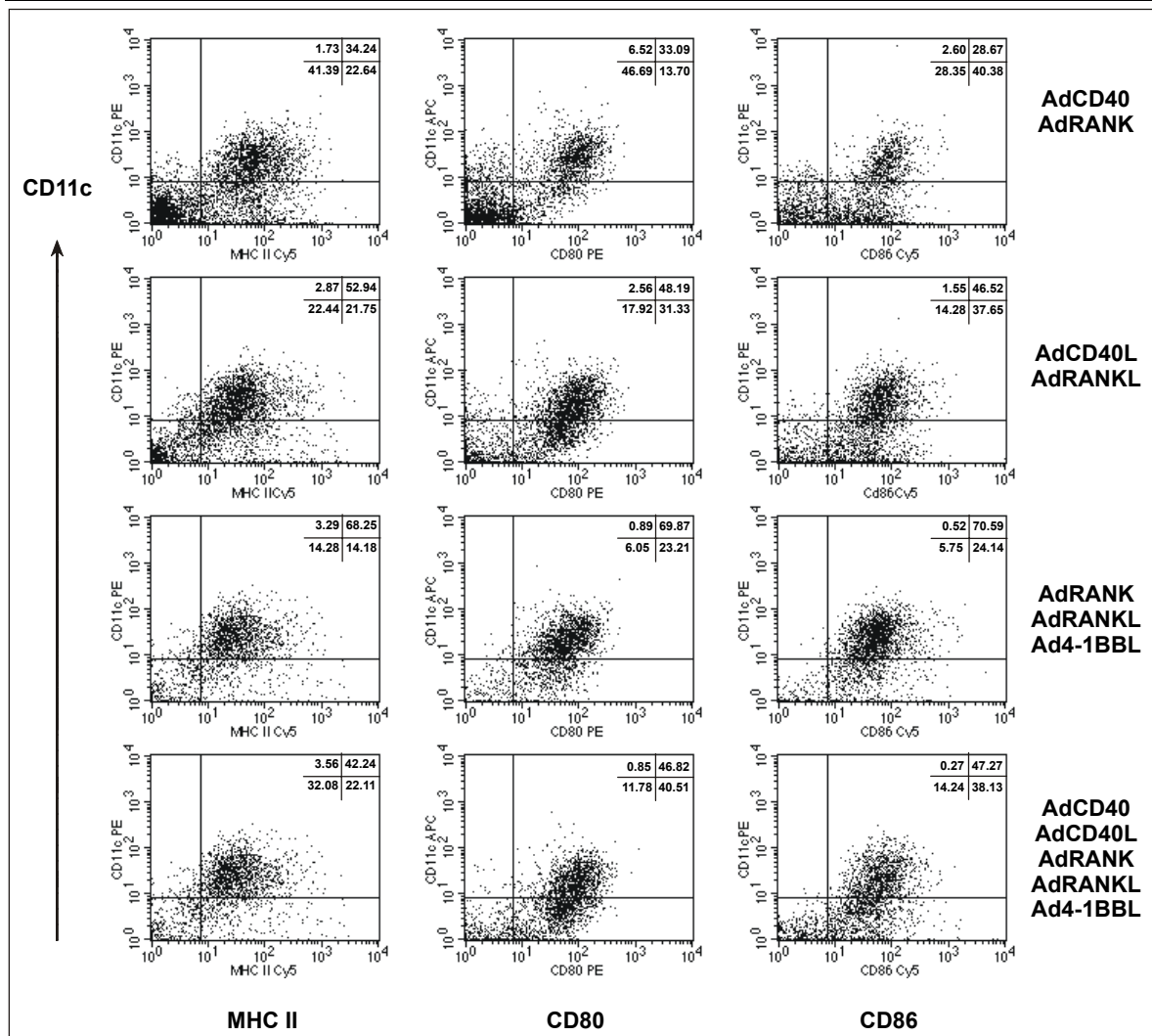


Abb. 3.23: Analyse der Expression von MHC II, CD80 und CD86 im FACS nach adenoviralem Gentransfer von kostimulatorischen Molekülen in murinen dendritischen Zellen. Dendritische Zellen wurden aus den Knochenmarksvorläuferzellen in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 generiert. Am Tag 4 erfolgte die Infektion der Zellen mit den angegebenen adenoviralen Vektoren (jeweils MOI 100). Am Tag 6 wurden die Zellen mit den Antikörpern spezifisch für CD11c, MHC II, CD80 oder CD86 (siehe Tab. 2.5) markiert und im FACS analysiert. Die Einstellung des PE-Kanals für CD11c und des Cy5-Kanals für MHC II bzw. CD86 hat sich während der Messung verschoben.

Da für die Koinfektion der Zellen für jeden Vektor eine MOI von 100 verwendet wurde und der adenovirale Gentransfer von CD40 und CD40L keinen Einfluß auf die untersuchten Oberflächenmoleküle zeigte (siehe oben), sollte untersucht werden, ob RANK, RANKL und 4-1BBL eine synergistische Wirkung auf die Expression von MHC II, CD80 und CD86 aufweisen, die durch die höhere Gesamt-MOI mit AdCD40 und AdCD40L inhibiert wurde. Durch die Koinfektion der Zellen mit AdRANK+AdRANKL+Ad4-1BBL konnte eine synergistische Wirkung nachgewiesen werden (Abb. 3.23). So nahm der Anteil der MHC II⁺-Zellen in Gegenwart von 4-1BBL von 71,17 % (AdRANK+AdRANKL) auf 82,43 % zu. Auch die Expression von CD80 und CD86 stieg von 84,26 % (AdRANK+AdRANKL) auf 93,08 % bzw. von 90,10 % (AdRANK+AdRANKL) auf 93,73 %. Die synergistische Wirkung von RANK, RANKL und 4-1BBL zeigte sich auch in der noch deutlicheren Reduktion der kontaminierenden doppelnegativen Zellen in Gegenwart von Ad4-1BBL im Vergleich zu AdRANK+AdRANKL alleine. Durch den

adenoviralen Gentransfer von RANK, RANKL und 4-1BBL konnte die synergistische Wirkung der kostimulatorischen Moleküle eindeutig nachgewiesen werden, da diese Kombination die stärkste Auswirkung auf die Expression von MHC II, CD80 und CD86 und eine weitere Optimierung der Ausreifungsbedingungen demonstrierte. Daß dieser synergistische Effekt nicht bei der Koinfektion mit allen kostimulatorischen Vektoren nachgewiesen wurde, könnte auf die größere Menge an Adenoviruspunkten, die sich negativ auf die Vitalität der Zellen ausgewirkt haben könnten, zurückzuführen sein. Aber auch ein inhibierender Effekt von CD40 und CD40L kann nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend wurde in diesem Kapitel gezeigt, daß dendritische Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen gewonnen und durch die Infektion mit adenoviralen Vektoren genetisch modifiziert werden konnten. Die Expression der HPV-16 Sequenzen nach Infektion mit den entsprechenden rekombinanten Adenoviren konnte in den dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle der TNF- und TNFR-Superfamilie nach Infektion mit den adenoviralen Vektoren führte zu einer phänotypischen Modifikation der dendritischen Zellen, da durch die Expression der kostimulatorischen Moleküle der Differenzierungszustand der dendritischen Zellen sowie die Expression von CD80 und CD86 deutlich zunahm. Durch die Kombination der kostimulatorischen Moleküle konnte ein synergistischer Effekt demonstriert werden, der zu einer weiteren Zunahme der Ausreifung und Expressionsintensität von CD80 und CD86 in den dendritischen Zellen führte. Besonders die Verstärkung der Expression von CD80 und CD86, die für die Interaktion mit T-Zellen bzw. für die Aktivierung der T-Zellen von Bedeutung sind, könnte für immuntherapeutische Ansätze von großem Interesse sein.

3.4 Analyse der HPV-16-spezifischen Immunantwort nach Vakzinierung mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen

Die Frage, ob die durch die Infektion mit den rekombinanten Adenoviren genetisch modifizierten dendritischen Zellen eine spezifische Immunantwort gegen die exprimierten HPV-16 Sequenzen induzieren können, wurde *in vivo* in einem Mausmodell untersucht. Für diese Experimente wurden A2.1K^b-transgene Mäuse ausgewählt, die ein chimäres HLA-Molekül bestehend aus der α -1 und α -2 Domäne des HLA-A*0201 und der α -3 Domäne von H-2K^b in einem H-2^b-Hintergrund exprimieren²⁶³. Somit bietet dieses Modell die Möglichkeit gleichzeitig die zelluläre T-Zellantwort, die durch das murine MHC I bzw. durch das humane HLA-A*0201 restringiert ist, zu analysieren.

Das HPV-16 E7-Protein ist ein ideales und gut charakterisiertes Antigen mit Relevanz bei der Entwicklung von Zervixkarzinomen (siehe 1.1). In Abb. 3.24 sind die durch das murine H-2D^b bzw. durch das humane HLA-A*0201 (A2.1) präsentierten CTL-Epitope von E7 dargestellt, die in dem A2.1K^b-transgenen Mausmodell untersucht werden können. Durch die Mutationen in der verwendeten E7-Variante E7mut²⁹¹ in AdE7 und AdL1p/E7, wurde unter anderem die Sequenz des CTL-Epitopes 597 (Position 91: C→G) modifiziert. Diese Mutation könnte sich auf die Bindung des CTL-Epitopes 597 an das MHC I-Molekül und/oder auf die spezifische Erkennung des MHC I/Peptid-Komplexes durch den

Um die Effizienz der L1/E7-Fusionsproteine mit dem gesamten E7 in bezug auf die Initiation einer E7- bzw. L1-spezifischen Immunantwort untersuchen zu können, wurden AdE7-infizierte dendritische Zellen mit AdL1p-infizierten dendritischen Zellen kombiniert. Da hier ein therapeutischer Ansatz, also die Initiation einer T-Zellantwort gegen HPV-16 im Vordergrund stand, wurde die Effizienz von AdL1p/E7₁₋₆₀-infizierten dendritischen Zellen nicht analysiert, da dieses Konstrukt im Gegensatz zu AdE7 und AdL1p/E7 nicht die beiden A2.1-restringierten CTL-Epitope am C-Terminus von E7 enthält (Abb. 3.24).

Für die Experimente zur Initiation einer HPV-16-spezifischen Immunantwort wurden die A2.1K^b-transgenen Mäuse subkutan (s.c.) mit den dendritischen Zellen bzw. dem Peptid des CTL-Epitopes immunisiert. Nach einer zehntägigen Inkubationszeit wurde mit der Analyse der HPV-16-spezifischen Immunantwort begonnen. Für die Charakterisierung des Immunstatus der immunisierten Mäuse wurde die HPV-16-spezifische T-Zellantwort und Antikörperantwort gegen L1 untersucht. Für die Untersuchung der T-Zellantwort wurde die Initiation einer direkten HPV-16-spezifischen Effektor-T-Zellantwort zehn Tage nach der Immunisierung durch den *ex vivo* IFN γ -ELISPOT sowie die Induktion einer *memory* T-Zellantwort nach einer sechstägigen *in vitro* Restimulation durch den IFN γ -ELISPOT und den ⁵¹Chromium-Zytotoxizitätsassay (CTL-Assay) analysiert.

3.4.1 Vorversuche zur Immunisierung mit Peptid bzw. Protein

Für die Untersuchung der HPV-16-spezifischen T-Zellantwort in dem A2.1K^b-transgenen Modell wurden die zur Verfügung stehenden HPV-16 E7- und L1-spezifischen CTL-Epitope sowie die Prozessierung und Präsentation der E7-spezifischen CTL-Epitope in einigen Vorversuchen kontrolliert (Abb. 3.25). Dafür wurde die Induktion einer spezifischen *memory* T-Zellantwort nach Immunisierung der A2.1K^b-transgenen Mäuse subkutan mit den Peptiden der CTL-Epitope in Adjuvants (siehe 2.7.3) nach einer sechstägigen *in vitro* Restimulation der aus der Milz gewonnenen Lymphozyten durch den CTL-Assay untersucht. Für die späteren Arbeiten mit dendritischen Zellen wurden die in der Milz enthaltenen adhärennten professionellen Antigen-präsentierende Zellen (APC) depletiert, um mögliche Interferenzen mit FCS-spezifischen CTL-Epitopen, die während der *in vitro* Restimulation durch die APCs präsentiert werden und zur Amplifikation einer unspezifischen T-Zellantwort führen könnten, zu verhindern³⁰⁵. Aus diesem Grund wurden die Milzzellen nach APC-Depletion mit EL4.E7, die HPV-16 E7 endogen exprimieren und das H2-D^b restringierte CTL-Epitop von E7 (8Q) präsentieren, oder mit EL4.A2.1, die mit dem Peptid des entsprechenden A2.1-restringierten CTL-Epitopes beladen wurden, restimuliert. Ein weiterer Grund der Restimulation mit E7-exprimierenden Zellen war die Beobachtung, daß in Mäusen mit H-2^b-Hintergrund die Restimulation allein durch Zugabe des Peptides nur zu einer ineffizienten Amplifikation der spezifische Immunantwort führte, wenn die CTL-Epitope zuvor aus einem exprimierten Protein prozessiert werden mußten (persönl. Mitteilung von A. Suhrbier, QIMR). Für die Restimulation wurden Milzzellen mit Stimulatorzellen im Verhältnis 10:1 gemischt. Die Effizienz der zellulären Restimulationsmethode wurde im CTL-Assay mit Zellen verglichen, die ohne APC-Depletion durch Zugabe des entsprechenden Peptides restimuliert wurden.

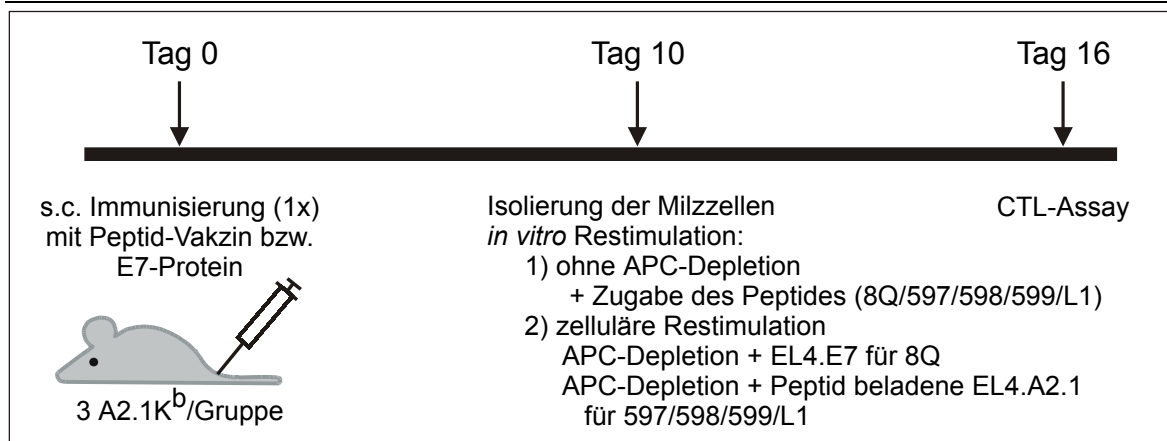


Abb. 3.25: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Vorversuche zur Immunisierung mit Peptid bzw. Protein und anschließender Untersuchung der HPV-16-spezifischen *memory* T-Zellantwort. Erläuterungen siehe Text.

Der CTL-Assay (Abb. 3.26 A, B) zeigte, daß nach der Immunisierung mit dem Peptid mit beiden Restimulationsmethoden eine für das murine H-2D^b-restringierte CTL-Epitop 8Q spezifische Lyse der endogen E7-exprimierenden EL4.E7 sowie der mit dem 8Q-Peptide-beladenen EL4.A2.1 nachgewiesen werden konnte. Für das Effektorzellen zu Targetzellen Verhältnis von 50:1 betrug die Zytotoxizität bei der *in vitro* Restimulation ohne APC-Depletion durch Zugabe des Peptides für EL4.E7 73,4 % \pm 3,6 % bzw. 53,3 % \pm 2,4 % für 8Q-beladene EL4.A2.1 und 7,2 % \pm 0,4 % für die Kontrolltargetzellen (EL4.A2.1) im Vergleich zu 81,3 % \pm 1,8 % für EL4.E7 bzw. 88,9 % \pm 2,4 % für EL4.A2.1+8Q und 19,9 % \pm 0,6 % mit APC-Depletion und Restimulation mit EL4.E7. Für das 10:1 Verhältnis betrug die Lyse der Targetzellen, die das H-2D^b-restringierte E7 CTL-Epitop präsentierten, nach Restimulation durch Zugabe des Peptides 43,9 % \pm 2,3 % (EL4.E7) bzw. 26,6 % \pm 0,6 % (EL4.A2.1+8Q) und 1,8 % \pm 0,3 % für die EL4.A2.1 Kontrolltargets. Nach zellulärer *in vitro* Restimulation ergab sich eine Zytotoxizität von 66,0 % \pm 3,6 % für EL4.E7 bzw. 68,8 % \pm 2,5 % für EL4.A2.1+8Q und 6,2 % \pm 1,9 % für die EL4.A2.1. Somit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Restimulationsmethoden für das H-2D^b-restringierte E7 CTL-Epitop 8Q festgestellt werden.

Für das A2.1-restringierte E7 CTL-Epitop 598 zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Restimulationsmethoden (Abb. 3.26 A, B). Mit der *in vitro* Restimulation ohne APC-Depletion durch Zugabe des Peptides konnte eine spezifische Lyse der 598-beladenen EL4.A2.1 Targetzellen mit 41,7 % \pm 1,6 % (50:1) bzw. 19,4 % \pm 1,0 % (10:1) gegenüber 24,9 % \pm 1,2 % (50:1) bzw. 10,4 % \pm 0,2 % (10:1) für die Kontrolltargetzellen (EL4.A2.1) nachgewiesen werden. Die Lyse der 598-beladenen EL4.A2.1 Targetzellen nach zellulärer Restimulation betrug 30,5 % \pm 2,3 % (50:1) bzw. 10,3 % \pm 0,7 % (10:1) und 15,7 % \pm 0,6 % (50:1) bzw. 4,2 % \pm 0,3 % (10:1) für EL4.A2.1. Die spezifische Lyse für das CTL-Epitop 598 von etwa 15 % ist charakteristisch für dieses CTL-Epitop (persönl. Mitteilung von R. Tindle, SASVRC).

Eine spezifische *memory* T-Zellantwort gegen das A2.1-restringierte CTL-Epitop 599 konnte nach keiner der beiden Restimulationsmethoden nachgewiesen werden (Abb. 3.26 A, B). Die Lyse der 599-beladenen EL4.A2.1 betrug nach Restimulation durch Zugabe des Peptides 22,1 % \pm 1,3 % (50:1) bzw. 6,5 % \pm 0,5 % (10:1) und 21,9 % \pm 0,4 %

(50:1) bzw. $6,2 \% \pm 0,1 \%$ (10:1) für die Kontrolltargets (EL4.A2.1). Nach zellulärer Restimulation wurden $41,1 \% \pm 0,3 \%$ (50:1) bzw. $15,8 \% \pm 2,1 \%$ (10:1) der EL4.A2.1+599 und $48,0 \% \pm 3,9 \%$ (50:1) bzw. $18,8 \% \pm 2,8 \%$ (10:1) der EL4.A2.1 lysiert. Dieses Ergebnis für 599 bestätigte die Erfahrungen der Arbeitsgruppe Tindle, die gegen dieses A2.1-restringierte CTL-Epitop keine spezifische T-Zellantwort demonstrieren konnten (persönl. Mitteilung von R. Tindle, SASVRC).

Für das E7 CTL-Epitop 597 und das CTL-Epitop in L1, die beide durch das transgene A2.1-Molekül präsentiert werden, konnte die Induktion einer spezifischen *memory* T-Zellantwort nach der Restimulation mit dem Peptid ohne APC-Depletion nachgewiesen werden, jedoch nicht nach APC-Depletion und Restimulation mit den Peptid-beladenen EL4.A2.1 (Abb. 3.26 A, B). Für 597 wurde nach Restimulation mit dem Peptid eine Zytotoxizität von $59,1 \% \pm 1,7 \%$ (50:1) bzw. $30,5 \% \pm 1,3 \%$ (10:1) für die 597-beladenen EL4.A2.1 und $24,5 \% \pm 2,1 \%$ (50:1) bzw. $9,2 \% \pm 0,8 \%$ (10:1) für die Kontrolltargets (EL4.A2.1) beobachtet. Dagegen betrug die Zytotoxizität nach APC-Depletion und Restimulation mit EL4.A2.1+597 $49,9 \% \pm 2,8 \%$ (50:1) bzw. $20,6 \% \pm 2,5 \%$ (10:1) für EL4.A2.1+597 und $46,4 \% \pm 1,8 \%$ (50:1) bzw. $20,2 \% \pm 1,2 \%$ (10:1) für EL4.A2.1. Für das L1 CTL-Epitop wurde nach Restimulation mit L1-beladenen EL4.A2.1 eine Lyse von $45,7 \% \pm 2,6 \%$ (50:1) bzw. $27,6 \% \pm 3,1 \%$ (10:1) für die EL4.A2.1+L1 nachgewiesen, die sich jedoch nicht eindeutig von der Lyse der Kontrolltargets (EL4.A2.1) mit $53,3 \% \pm 5,3 \%$ (50:1) bzw. $24,5 \% \pm 1,4 \%$ (10:1) unterschied. Dagegen unterschied sich die Lyse der EL4.A2.1+L1 nach Restimulation mit dem Peptid mit $55,1 \% \pm 1,7 \%$ (50:1) bzw. $28,1 \% \pm 0,5 \%$ (10:1) eindeutig von den Werten der EL4.A2.1 ($30,9 \% \pm 3,6 \%$ [50:1], $8,6 \% \pm 0,5 \%$ [10:1]). Dieser Unterschied der beiden Restimulationsmethoden für die CTL-Epitope 597 und L1 war unerwartet, da die Ergebnisse des CTL-Assays für die Restimulation mit dem jeweiligen Peptid demonstrierten, daß die EL4.A2.1 Zellen mit beiden Peptiden beladen werden konnten. Eine zeitlich limitierte Bindung der beiden Peptide an das transgene A2.1-Moleküle, die z.B. auf einer geringer Bindungsaffinität beruht, kann nicht ausgeschlossen werden. Durch die Dissoziation der gebundenen Peptide von den A2.1-Molekülen wäre die Menge an verfügbarem Peptid für die Restimulation deutlich geringer als die für die Restimulation mit dem freien Peptid zugegebene Menge.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse des CTL-Assays für die CTL-Epitope 597, 599 und L1 fiel auf, daß die Lyse der irrelevanten EL4.A2.1 Targetzellen nach zellulärer Restimulation mit den Peptid-beladenen EL4.A2.1 (Abb. 3.26 B) deutlich höher war als in der parallel durchgeführten Restimulation ohne APC-Depletion durch Zugabe der Peptides (Abb. 3.26 A). Die Ursache hierfür ist unklar.

Die in Abb. 3.26 A, B dargestellten Ergebnisse des CTL-Assays zeigen weiterhin, daß in dem A2.1K^b-transgenen Modell die A2.1-spezifischen Immunantworten schwächer waren als im Vergleich zu der durch das murine H-2D^b-restringierten Immunantwort. Diese Beobachtung kann auf die in der Literatur beschriebenen Limitierungen des ausgewählten Mausmodells, wie der geringen Frequenz an A2.1-spezifischen T-Zellen und die wahrscheinlich ineffiziente Interaktion des murinen CD8-Moleküls auf den CD8⁺ CTLs mit dem chimären A2.1K^b-Molekül³⁰⁶, zurückgeführt werden. Aber auch eine höhere Bindungsaffinität von 8Q gegenüber den A2.1-restringierten CTL-Epitopen für die Assoziation mit dem jeweiligen MHC I-Molekül kann als Ursache ebenso wie die

ineffizientere Prozessierung und Präsentation der A2.1-restringierten CTL-Epitope durch den murinen Antigenprozessierungsapparat nicht ausgeschlossen werden. Die effizientere Prozessierung und Präsentation eines CTL-Epitopes wird als Immundominanz bezeichnet. Durch Immundominanz des H-2D^b-restringierten 8Q Peptides könnte die Immunantwort gegen die A2.1-restringierten CTL-Epitope inhibiert werden, wenn die einzelnen CTL-Epitope zuvor aus dem E7-Protein prozessiert werden müssen, um präsentiert zu werden.

Um die Fragestellung der Prozessierungsfähigkeit näher zu untersuchen, wurden A2.1K^b-transgene Mäuse statt mit den Peptide, die ohne weitere Prozessierung direkt präsentiert werden können, mit dem HPV-16 E7-Protein (von G. Fernando, CICR, Brisbane) immunisiert und die *memory* T-Zellantwort nach *in vitro* Restimulation der Milzzellen durch Zugabe der jeweiligen Peptide im CTL-Assay analysiert (Abb. 3.25). Die Ergebnisse des CTL-Assays (Abb. 3.26 C) demonstrierten, daß nach der Immunisierung mit dem E7-Protein sowohl eine eindeutige *memory* T-Zellantwort gegen das H-2D^b-restringierte CTL-Epitop als auch gegen das A2.1-restringierte 597 nachgewiesen werden konnte, die nur durch die Prozessierung dieser Epitope aus dem Protein entstanden sein konnten. Für das H-2D^b-restringierte CTL-Epitop betrug die Lyse der EL4.A2.1+8Q 85,5 % ± 1,4 % (50:1) bzw. 74,0 % ± 3,8 % (10:1) im Vergleich zu 11,6 % ± 1,6 % (50:1) bzw. 6,6 % ± 2,0 % (10:1) für EL4.A2.1. Für 597 konnte eine Zytotoxizität von 43,4 % ± 0,6 % (50:1) bzw. 20,5 % ± 0,2 % (10:1) für EL4.A2.1+597 gegenüber 27,7 % ± 1,8 % (50:1) bzw. 11,0 % ± 1,1 % (10:1) für die EL4.A2.1 Kontrolltargetzellen nachgewiesen werden.

Wie nach der Immunisierung mit dem Peptid-Vakzin (Abb. 3.26 A, B) war die 597-spezifische Immunantwort im Vergleich zu der H-2D^b-spezifischen Immunantwort auch nach Immunisierung mit dem E7-Protein schwächer. Dieser Unterschied könnte auf die oben erwähnten Limitierungen des A2.1K^b-transgenen Modells beruhen. Aber auch effizientere Prozessierung und Präsentation von 8Q gegenüber 597 (Immundominanz) durch das murine Proteasom sowie eine höhere Bindungsaffinität für das jeweilige MHC I-Molekül für 8Q gegenüber 597 könnte die Ursache sein.

Im Gegensatz zu 597 konnte gegen das A2.1-restringierte CTL-Epitop 598 keine spezifische *memory* T-Zellantwort nach Immunisierung mit dem E7-Protein nachgewiesen werden (Abb. 3.26 C), obwohl nach Vakzinierung mit dem Peptid eine *memory* T-Zellantwort beobachtet worden war (Abb. 3.26 A, B). Die Lyse der 598-präsentierenden EL4.A2.1 betrug 21,8 % ± 1,5 % (50:1) bzw. 10,5 % ± 0,3 % (10:1) und unterschied sich nicht eindeutig von der Lyse der EL4.A2.1 (22,8 % ± 2,4 % [50:1], 8,5 % ± 2,7 % [10:1]). Trotz der Beschreibung von 598 als ein A2.1-restringiertes E7-Epitop²⁶² scheint dieses CTL-Epitop jedoch natürlicherweise nicht prozessiert zu werden. Auch Daten aus anderen Arbeiten, in denen eine Prozessierung von 598 aus E7 notwendig war, bestätigten dies³⁰⁷ (persönl. Mitteilung von R. Tindle, SASVRC). Aus diesem Grund erscheint die Nutzung von 598 als ein natürliches CTL-Epitop von E7 fragwürdig.

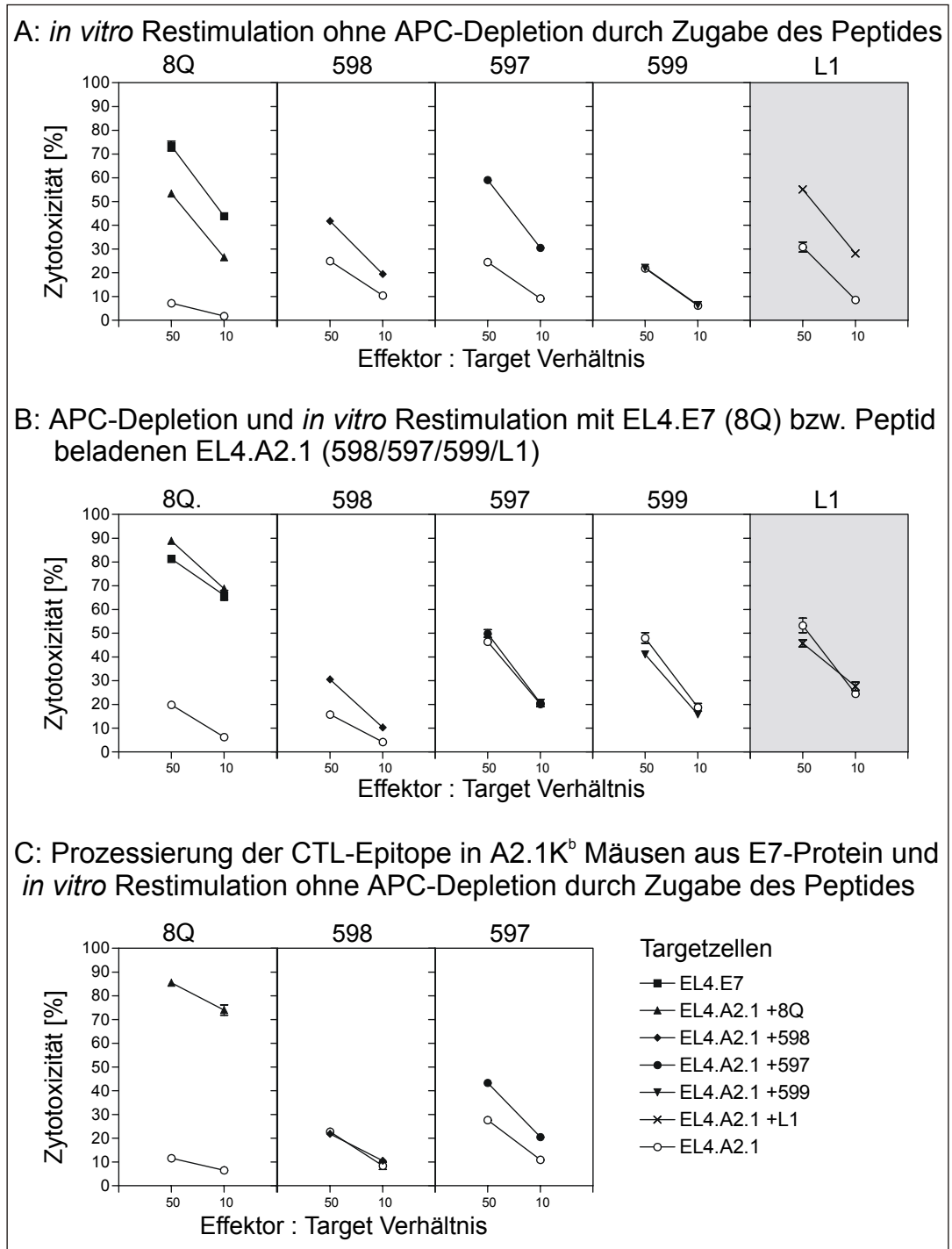


Abb. 3.26: Memory T-Zellantwort gegen die HPV-16 E7 bzw. L1 CTL-Epitope nach Immunisierung von A2.1K^b-transgenen Mäusen mit den jeweiligen Peptiden (A, B) bzw. mit E7 Protein (C). Der Ablauf erfolgte wie in Abb. 3.25 dargestellt. Die Restimulation erfolgte entweder durch Zugabe des entsprechenden Peptides (A, C) oder nach APC-Depletion mit EL4.E7 für 8Q oder mit dem jeweiligen Peptid-beladenen EL4.A2.1 im Verhältnis Milzzellen zu Stimulatorzellen von 10:1 (B). Die Immunantwort gegen die untersuchten CTL-Epitope wurde im CTL-Assay nachgewiesen.

Die Ergebnisse dieser Vorversuche bestätigten, daß sich das A2.1K^b-transgene Mausmodell für die Untersuchung der HPV-16-spezifischen H-2D^b und A2.1-restringierten T-Zellantwort nach Vakzinierung mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen eignet. Gegen drei der beschriebenen H-2D^b bzw. A2.1-restringierten E7 CTL-Epitope sowie das A2.1-restringierte L1 CTL-Epitop konnte eine spezifische *memory* T-Zellantwort nach

Immunisierung mit dem Peptid-Vakzin nachgewiesen werden. Für die beiden CTL-Epitope 597 und L1 konnte die T-Zellantwort nur nach Restimulation durch Zugabe des entsprechenden Peptides, jedoch nicht nach APC-Depletion und Restimulation mit Peptid-beladenen EL4.A2.1 detektiert werden. Aus diesem Grund wurden diese beiden Epitope primär für die Untersuchung der direkten Effektor-T-Zellantwort (3.4.2) verwendet und für die *memory* T-Zellantwort (3.4.2.2) beide Restimulationsmethoden parallel durchgeführt.

Die Immunisierung A2.1K^b-transgener Mäuse mit dem HPV-16 E7-Protein zeigte neben einer H-2D^b-spezifischen auch eine spezifische *memory* T-Zellantwort gegen das A2.1-restringierte 597. Dieses Ergebnis demonstrierte, daß die A2.1K^b-transgenen Mäuse die Fähigkeit besitzen, A2.1-restringierte CTL-Epitope zu prozessieren und an das chimäre A2.1K^b-Molekül zu binden. Die Frage der Notwendigkeit einer zellulären Restimulation bei einem Modell mit H-2^b-Hintergrund bleibt unbeantwortet, da nach Immunisierung mit dem E7-Protein und einer *in vitro* Restimulation durch Zugabe der entsprechenden Peptide eine spezifische *memory* T-Zellantwort nachweisbar war. Die Notwendigkeit der zellulären Restimulation bei Vakzinen, die *in vivo* exprimiert werden, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

3.4.2 HPV-16-spezifische Immunantwort nach Immunisierung mit Adenovirus-infizierten dendritischen Zellen

Für die Untersuchung des immunstimulatorischen Potentials der genetisch modifizierten dendritischen Zellen zur Initiation einer spezifischen Immunantwort gegen die exprimierten HPV-16 Antigene, wurde der Immunstatus der immunisierten A2.1K^b-transgenen Mäuse analysiert. Die Analyse des Immunstatus erfolgte durch die Charakterisierung der HPV-16 L1-spezifischen Antikörperantwort (3.4.2.3) und der HPV-16 E7- bzw. L1-spezifischen T-Zellantwort. Durch die Aktivierung der naiven T-Lymphozyten wird ihre Differenzierung in Effektorzellen, die für die akute Immunantwort verantwortlich sind, und in *memory* T-Zellen, die für erneute Immunantworten von Bedeutung sind, induziert. Aus diesem Grund wurden für die Analyse der HPV-16-spezifischen Immunantwort nach Immunisierung mit den dendritischen Zellen sowohl die direkte Effektor-T-Zellantwort (3.4.2.1) als auch die *memory* T-Zellantwort (3.4.2.2) untersucht. Die Bestimmung der direkten HPV-16-spezifischen Effektor-T-Zellantwort erfolgte durch den *ex vivo* IFN γ -ELISPOT, indem die spezifische IFN γ -Sekretion durch die isolierten Milzzellen in Gegenwart des untersuchten CTL-Epitopes ohne vorherige *in vitro* Restimulation analysiert wurden. Die Initiation einer HPV-16-spezifischen *memory* T-Zellantwort wurde nach einer sechstägigen *in vitro* Restimulation der isolierten Milzzellen durch den IFN γ -ELISPOT sowie den parallel durchgeführten CTL-Assay bestimmt. Die *in vitro* Restimulation diente zur Aktivierung und Amplifikation der vorhandenen HPV-16-spezifischen *memory* T-Zellen und erfolgte nach APC-Depletion mit der konstitutiv E7-exprimierenden Zelllinie EL4.E7 für das H-2D^b-restringierte CTL-Epitop 8Q oder mit dem Peptid-beladenen EL4.A2.1 für das A2.1-restringierte E7 CTL-Epitop 598 (Abb. 3.27). Für die beiden A2.1-restringierten CTL-Epitope 597 und L1 wurden zwei *in vitro* Restimulationsmethoden, mit APC-Depletion und Peptid-beladenen EL4.A2.1 bzw. ohne APC-Depletion und Zugabe des Peptides, parallel durchgeführt, da eine spezifische *memory* T-Zellantwort

nach Immunisierung mit dem Peptid nur nach Restimulation durch Zugabe des Peptides ohne APC-Depletion nachgewiesen wurde (Abb. 3.26 A, B).

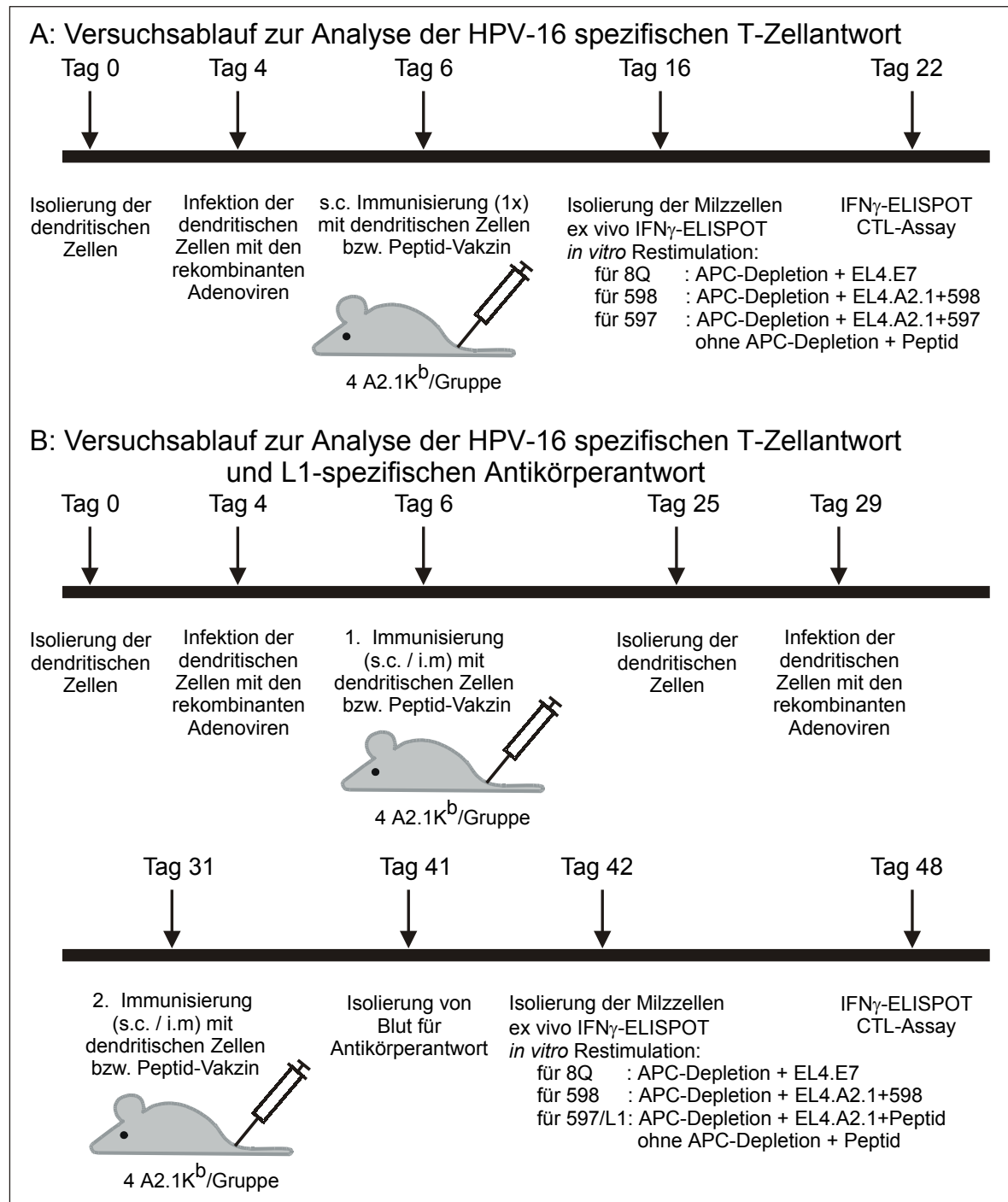


Abb. 3.27: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Immunisierungsversuche mit dendritischen Zellen. (A) Ablauf zur Untersuchung der HPV-16-spezifischen Effektor- und *memory* T-Zellantwort nach einer Immunisierung. (B) Versuchsverlauf zur Untersuchung der L1-spezifischen Antikörperantwort und HPV-16 E7- bzw. L1-spezifischen T-Zellantwort nach zwei Immunisierungen. Erläuterungen siehe Text.

Für die *in vivo* Experimente zur Initiation einer HPV-16-spezifischen T-Zellantwort (Abb. 3.27 A) wurden dendritische Zellen aus den Knochenmarksvorläuferzellen von A2.1K^b-transgenen Mäusen in Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 gewonnen und am Tag 4 nach der Isolation mit den entsprechenden adenoviralen Konstrukten infiziert. Am Tag 6

nach der Isolation wurden die Zellen geerntet, dreimal mit PBS gewaschen und A2.1K^b-transgene Mäuse (4 pro Gruppe) mit 5×10^5 Zellen/Maus subkutan an der Schwanzbasis immunisiert. Zur Evaluierung der Effizienz dendritischer Zellen wurde vier A2.1K^b-transgenen Mäusen mit den jeweiligen Peptiden der HPV-16 CTL-Epitope immunisiert. Zehn Tage nach der Immunisierung der Mäuse wurde die Milzzellen isoliert und für den *ex vivo* IFN γ -ELISPOT zur Bestimmung der direkten HPV-16-spezifischen Effektor-T-Zellantwort bzw. nach sechstägiger *in vitro* Restimulation zur Analyse der *memory* T-Zellantwort verwendet.

Um die Bedingungen für die mögliche Induktion einer L1-spezifischen Antikörperantwort durch Immunisierung mit den genetisch modifizierten dendritischen Zellen zu optimieren, wurde das Standardimmunisierungsprotokoll (Abb. 3.27 A) nach Mercier et al.¹⁵⁹ modifiziert, da nach intramuskulärer Immunisierung mit Adenovirus-infizierten dendritischen Zellen mindestens 20-25 Tage für die Induktion einer nachweisbaren Antikörperantwort benötigt wurden. Aus diesem Grund wurden, wie in Abb. 3.27 B dargestellt, die A2.1K^b-transgenen Mäusen (4/Gruppe) jeweils mit 5×10^5 dendritischen Zellen immunisiert und 25 Tage ein zweites Mal mit 5×10^5 dendritischen Zellen pro Maus immunisiert, um das zehntägige Intervall für die T-Zellantwort (Abb. 3.27 A) beizubehalten. Aber auch der Effekt der Immunisierungsrouten auf die L1-spezifische Antikörperantwort wurde untersucht. Dafür wurde eine Gruppe von Mäusen intramuskulär statt subkutan mit dendritischen Zellen immunisiert. Am Tag 35 nach der ersten Immunisierung wurde mit der Analyse der Antikörperantwort begonnen und ein Tag später erfolgte mit der Isolation der Milz die Untersuchung der HPV-16-spezifischen T-Zellantwort.

3.4.2.1 Analyse der direkten Effektor-T-Zellantwort

In den ersten Versuchen erfolgte die Untersuchung der HPV-16 E7-spezifischen Effektor-T-Zellantwort nach dem Schema in Abb. 3.27 A durch den *ex vivo* IFN γ -ELISPOT. In diesem Test wird die Anzahl der spezifischen T-Zellen unter den Milzzellen bestimmt, die mit ihren TCR das untersuchte CTL-Epitop im Kontext eines MHC I-Moleküls erkennen und IFN γ -sekretieren. Die IFN γ -sekretierenden Zellen können nach der Detektion als Spots auf der Cellulose-Membran der ELISPOT-Platten (siehe Abb. 3.37) ausgewertet werden. Die Anzahl der spezifisch für das CTL-Epitop IFN γ -sekretierenden Zellen unter 10^6 Milzzellen diente als Maß für die Induktion einer Effektor-T-Zellantwort.

Abhängigkeit der Effektor-T-Zellantwort von der MOI:

Die dendritischen Zellen wurden mit unterschiedlichen MOIs von AdE7 infiziert, um die optimale MOI für die Induktion einer H-2D^b-restringierten E7-spezifischen T-Zellantwort zu ermitteln (Abb. 3.28). Die Ergebnisse des *ex vivo* IFN γ -ELISPOT zeigten eine eindeutige H-2D^b-restringierte E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort in den Mäusen, die mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen immunisiert wurden. Die Anzahl der IFN γ -sekretierenden Zellen als Maß für die Effizienz der Immunisierung bzw. der Induktion einer Effektor-T-Zellantwort war dabei proportional zu der verwendeten MOI von AdE7 für die Infektion der dendritischen Zellen. Die Infektion der dendritischen Zellen mit rekombinanten Adenoviren hatte keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl der IFN γ -sekretierenden Zellen/ 10^6 Milzzellen spezifisch für das H-2D^b-restringierte E7 CTL-Epitop 8Q (Adegfp: $3 \pm 1,4$, Mock: $0 \pm 1,4$; $p = 0,146$). Mit einer MOI von 50 für

AdE7 konnte eine schwache H-2D^b-restringierte Effektor-T-Zellantwort (10 ± 0) induziert werden. Dendritische Zellen infiziert mit einer MOI von 125 für AdE7 induzierten eine signifikant höhere H-2D^b-restringierte Effektor-T-Zellantwort ($29 \pm 4,2$) als Mock-infizierte ($p < 0,0001$) und Adegfp-infizierte Zellen ($p = 0,0003$). Mit einer MOI von 125 konnte eine H-2D^b-restringierte E7-spezifische Effektor-T-Zellimmunantwort induziert werden, die vergleichbar war mit derjenigen nach Immunisierung der Mäuse mit dem Peptid-Vakzin ($32 \pm 5,7$). Wenn die dendritischen Zellen mit einer MOI von 250 für AdE7 infiziert wurden, war die H-2D^b-restringierte E7-spezifische Effektor-T-Zellimmunantwort signifikant höher ($51 \pm 1,4$; $p = 0,0016$) als mit dem Peptid-Vakzin.

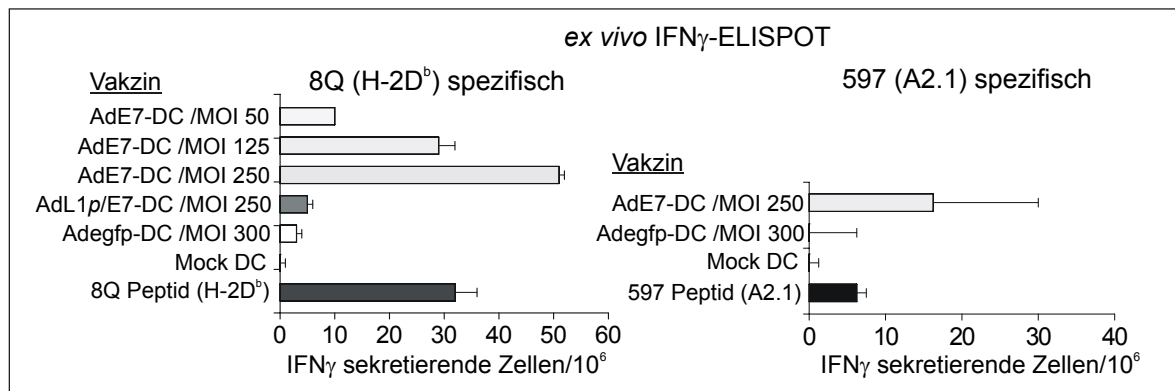


Abb. 3.28: Direkte HPV-16 E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort nach Immunisierung mit dendritischen Zellen (DC). Die A2.1K^b-transgenen Mäuse (4/Gruppe) wurden, wie in Abb. 3.27 A dargestellt, subkutan mit 5×10^5 dendritischen Zellen/Maus immunisiert, die aus Knochenmarkszellen mit GM-CSF und IL-4 generiert wurden. Die Zellen wurden am Tag 4 mit den angegebenen adenoviralen Vektoren und der jeweiligen MOI bzw. Mock infiziert. Als Kontrolle wurde eine Gruppe von Mäusen mit dem Peptid-Vakzin immunisiert. Zehn Tage nach der Immunisierung wurde die Milz isoliert und die H-2D^b- sowie A2.1-restringierte HPV-16 E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort durch den ex vivo IFN_γ-ELISPOT bestimmt.

Abhängigkeit der Effektor-T-Zellantwort von der Stabilität des exprimierten Antigens:

Wenn die dendritischen Zellen mit AdL1p/E7 (MOI 250) statt AdE7 infiziert wurden, konnte keine signifikant höhere H-2D^b-restringierte E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort ($5 \pm 1,4$; $p = 0,2212$) als mit Mock-infizierten dendritischen Zellen ($0 \pm 1,4$) beobachtet werden (Abb. 3.28). Dieses Ergebnis war unerwartet, da sich E7 in den beiden viralen Konstrukten nicht unterscheidet und für die Infektion mit AdL1p/E7 die für AdE7 optimale MOI von 250 verwendet wurde. Das in AdE7 und in AdL1p/E7 verwendete E7mut unterscheidet sich von dem Wildtyp HPV-16 E7 neben der geringeren Transformationsaktivität, die aus sicherheitstechnischen Gründen bei der Verwendung human-infektiöser Vektoren vorteilhaft ist, auch durch eine erhöhte Immunogenität aus, die auf eine höhere Instabilität und damit verbundene effizientere Abbau- bzw. Prozessierungsrate von E7mut gegenüber dem Wildtyp Protein zurückgeführt wird²⁹¹. Wie bei dem Nachweis der E7-Expression in humanen dendritischen Zellen (3.3.2.2) bereits beobachtet wurde (Abb. 3.21 A), könnte durch die Fusion von E7mut mit L1 ein stabileres Protein exprimiert werden, was sich auf die Immunogenität der E7-spezifischen CTL-Epitope auswirken könnte. Auf dieser möglichen Stabilisierung durch L1 und der daraus resultierenden geringeren Prozessierung der E7 CTL-Epitope könnte der Unterschied in der induzierten Effektor-T-Zellantwort zwischen AdE7- und AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen beruhen. Aber auch andere Ursachen neben der Stabilitätszunahme können nicht ausgeschlossen werden. So

scheint die Expression von HPV-16 L1 in dendritischen Zellen möglicherweise einen toxischen Effekt auf dendritische Zellen zu haben (persönl. Mitteilung von R. Thomas, CICR). Allerdings wurde im Rahmen dieser Arbeit kein toxischer Effekt der L1-Expression auf die murinen dendritischen Zellen festgestellt, weshalb die Stabilisierung von E7mut durch die Fusion mit L1 favorisiert wird.

A2.1-restringierte Effektor-T-Zellantwort gegen das E7 CTL-Epitop 597:

Neben der H-2D^b-restringierten wurde auch die A2.1-restringierte 597-spezifische Effektor-T-Zellantwort nach Immunisierung mit den genetisch modifizierten dendritischen Zellen im *ex vivo* IFN γ -ELISPOT untersucht (Abb. 3.28). Wie nach der Immunisierung mit dem Peptid-Vakzin bzw. Protein (Abb. 3.26) zeigte sich auch im *ex vivo* IFN γ -ELISPOT, daß die A2.1-restringierte Immunantwort in dem A2.1K^b-transgenen Mausmodell schwächer war als die durch das murine MHC I restringierte Immunantwort. Nach der Immunisierung der Mäuse mit dendritischen Zellen, die mit AdE7 (MOI 250) infiziert wurden, konnte eine im Vergleich zu AdeGfp-infizierten ($0 \pm 8,8$) bzw. Mock-infizierten dendritischen Zellen ($0 \pm 1,8$) schwache 597-spezifische Effektor-T-Zellantwort ($16,2 \pm 19,4$) beobachtet werden, die jedoch nicht signifikant höher war als mit AdeGfp-infizierten dendritischen Zellen ($p = 0,39$). Trotz der gezeigten 597-spezifischen *memory* T-Zellantwort nach Immunisierung mit dem Peptid (Abb. 3.26) konnte keine signifikante Effektor-T-Zellantwort gegen 597 detektiert werden ($6,2 \pm 1,8$; $p = 0,4372$ zu Mock-infizierten dendritischen Zellen). Aus diesem Grund könnte das Ergebnis mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen auf den Limitierungen des A2.1K^b-transgenen Modells beruhen (siehe 3.4.1) und die *in vitro* Restimulation zur Amplifikation der A2.1-spezifischen T-Zellen essentiell für den Nachweis einer spezifischen Immunantwort sein. Die höhere Variabilität für den 597-spezifischen *ex vivo* IFN γ -ELISPOT könnte auf die geringe Frequenz an A2.1-spezifischen T-Zellen in dem Modell zurückgehen. Aber auch die Mutation des 597 CTL-Epitopes in E7mut (siehe Abb. 3.24), welche die Bindung von 597 an das MHC I-Molekül und/oder die spezifische Erkennung des MHC I/Peptid-Komplexes durch den TCR beeinträchtigen könnte, kann als Ursache nicht ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse dieser ersten Versuche haben gezeigt, daß genetisch modifizierte dendritische Zellen eine HPV-16 E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort nach Infektion mit AdE7 induzieren können. Dabei stellte sich heraus, daß die Verfügbarkeit und möglicherweise auch die Stabilität des exprimierten Antigens die Stärke der durch die dendritischen Zellen initiierten spezifischen Immunantwort beeinflusst. Für die Infektion der dendritischen Zellen mit AdE7 war eine MOI von 250 optimal, da auch eine weitere Erhöhung der MOI nicht zu einer Verbesserung der Immunantwort führte (nicht gezeigt).

Für die Untersuchung der durch die dendritischen Zellen induzierten L1-spezifischen Antikörperantwort und der gleichzeitigen Initiation einer HPV-16 E7- und L1-spezifischen T-Zellantwort wurde der Versuchsablauf wie in Abb. 3.27 B dargestellt modifiziert, um die Bedingungen für die Induktion einer L1-spezifischen Antikörperantwort (3.4.2.3) wie nach Mercier et al.¹⁵⁹ zu optimieren. Die A2.1K^b-transgenen Mäusen (4/Gruppe) wurden zweimal subkutan oder intramuskulär (siehe Abb. 3.29) mit dendritischen Zellen bzw. dem

Peptid-Vakzin immunisiert. Die Effizienz von AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen zur Initiation einer L1- und E7-spezifischen T-Zellantwort wurde mit AdE7- bzw. AdL1p-infizierten dendritischen Zellen verglichen. Für die Infektion der dendritischen Zellen mit den adenoviralen Konstrukten wurde für AdE7 eine MOI von 250 und für AdL1p sowie AdL1p/E7 eine MOI von 300 verwendet. Am Tag 36 nach der ersten Immunisierung wurden die Milzzellen isoliert, und die Untersuchung der HPV-16 E7- bzw. L1-spezifischen Effektor-T-Zellantwort erfolgte durch den *ex vivo* IFN γ -ELISPOT als Anzahl der spezifisch für das CTL-Epitop IFN γ -sekretierenden Zellen unter 10^6 Milzzellen.

Abhängigkeit der Effektor-T-Zellantwort von einer zweiten Immunisierung:

In Abb. 3.29 sind die Ergebnisse des *ex vivo* IFN γ -ELISPOT für die Untersuchung der H-2D^b-restringierten E7-spezifischen Effektor-T-Zellantwort nach zwei Immunisierungen dargestellt. Die Anzahl der spezifisch für das H-2D^b-restringierte E7 CTL-Epitop IFN γ -sekretierenden Zellen war nach Immunisierung mit dendritischen Zellen, die mit AdE7 (MOI 250) infiziert wurden, signifikant höher ($674 \pm 8,5$; $p < 0,0001$) als nach der subkutanen Immunisierung mit AdL1p-infizierten dendritischen Zellen ($52 \pm 19,8$) bzw. mit dem Peptid-Vakzin ($126 \pm 0,0$; $p < 0,0001$). Die gleichzeitige intramuskuläre Injektion von AdL1p-infizierten dendritischen Zellen hatte keinen signifikanten Einfluß auf die E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort durch die subkutane Immunisierung mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen ($582 \pm 19,8$), die ebenfalls signifikant höher war als mit AdL1p-infizierten dendritischen Zellen ($p < 0,0001$).

Im Vergleich zu den Ergebnissen der H-2D^b-restringierten E7-spezifischen Effektor-T-Zellantwort nach einer Immunisierung mit dendritischen Zellen, die mit einer MOI von 250 für AdE7 infiziert wurden (Abb. 3.28) nahm die Anzahl der H-2D^b-restringierten E7-spezifischen IFN γ -sekretierenden Zellen durch die zweite Immunisierung um den Faktor 6 zu ($p < 0,0001$). In den Mäusen, die zweimal mit dem Peptid-Vakzin immunisiert wurden, wurde eine Erhöhung der IFN γ -sekretierenden Zellen um den Faktor 3 nachgewiesen ($p < 0,0001$).

Wie zuvor nach einer Immunisierung mit AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen (Abb. 3.28) konnte auch nach einer zweiten Immunisierung (Abb. 3.29) keine signifikant höhere E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort ($27 \pm 32,5$; $p = 0,5583$) als mit AdL1p-infizierten dendritischen Zellen nachgewiesen werden, was vermutlich auf die Stabilitätszunahme von E7mut durch die Fusion mit L1 zurückzuführen ist.

A2.1-restringierte Effektor-T-Zellantwort gegen das L1 CTL-Epitop:

Zusätzlich zu der E7-spezifischen wurde in dem in Abb. 3.29 dargestellten Experiment auch die Effektor-T-Zellantwort spezifisch für das A2.1-restringierte L1 CTL-Epitop durch den *ex vivo* IFN γ -ELISPOT untersucht. Wie in den Vorversuchen (Abb. 3.26) sowie für das A2.1-restringierte E7 CTL-Epitop 597 (Abb. 3.28) war auch hier die A2.1-spezifische Immunantwort deutlich schwächer als die H-2D^b-restringierte. Die zweimalige subkutane Immunisierung mit AdL1p-infizierten ($0 \pm 2,8$; $p = 0,3144$) oder AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen ($5 \pm 9,9$; $p = 0,9172$) führte zur Induktion einer sehr schwachen L1-spezifischen Effektor-T-Zellantwort, die nicht signifikant höher war als mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen ($0 \pm 2,8$). Auch nach zweimaliger intramuskulärer Immunisierung mit AdL1p-infizierten dendritischen Zellen ($4 \pm 5,7$; $p = 0,7226$ bzw. $2 \pm 14,1$;

$p = 0,4100$ bei gleichzeitiger Immunisierung mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen) konnte nur eine schwache L1-spezifische Effektor-T-Zellantwort nachgewiesen werden, die im Vergleich zu AdE7-infizierten dendritischen Zellen nicht signifikant war. In den A2.1K^b-transgenen Mäusen, die zweimal subkutane mit dem L1-Peptid immunisiert wurden, war die Anzahl der L1-spezifisch IFN γ -sekretierenden Zellen ($3 \pm 1,4$; $p = 1$) ebenfalls nicht signifikant höher als nach der Immunisierung mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen. Da eine L1-spezifischen *memory* T-Zellantwort nach Immunisierung mit dem L1-Peptid in den Vorversuchen gezeigt werden konnte (Abb. 3.26), war dieses Ergebnis unerwartet. Wie die Ergebnisse der 597-spezifischen Effektor-T-Zellantwort ist auch die L1-spezifische Antwort vermutlich auf die Limitierungen des A2.1K^b-transgenen Modells (siehe 3.4.1) zurückzuführen. Auch die höhere Variabilität des L1-spezifischen *ex vivo* IFN γ -ELISPOTs deutet auf die geringe Frequenz an A2.1-spezifischen T-Zellen als Ursache hin, so daß die *in vitro* Restimulation für den eindeutigen Nachweis einer A2.1-restringierten T-Zellantwort vermutlich notwendig ist.

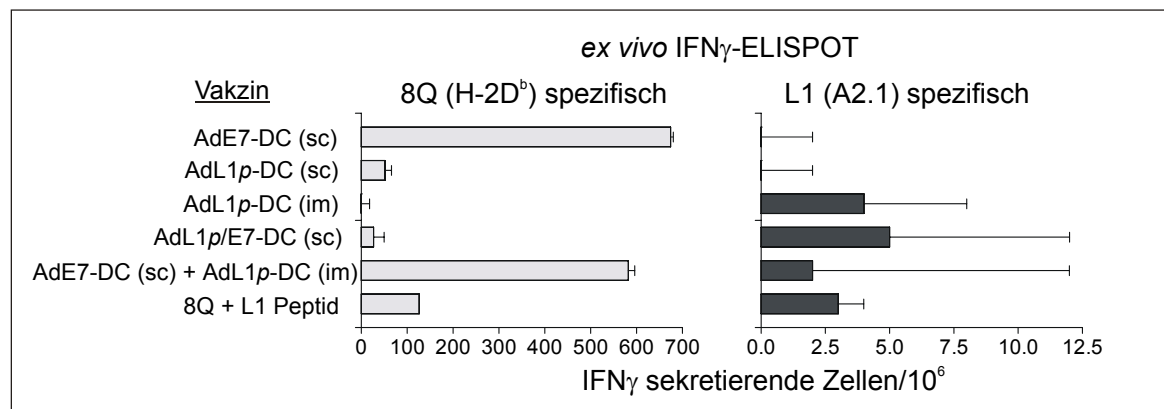


Abb. 3.29: Direkte HPV-16 E7- und L1-spezifische Effektor-T-Zellantwort nach Immunisierung mit dendritischen Zellen (DC). Die A2.1K^b-transgenen Mäuse (4/Gruppe) wurden nach Abb. 3.27 B subkutan (sc) und/oder intramuskulär (im) mit 5×10^5 dendritischen Zellen pro Maus immunisiert, die aus Knochenmarkszellen mit GM-CSF und IL-4 generiert wurden. Die Infektion der dendritischen Zellen erfolgte am Tag 4 nach der Isolation mit einer MOI von 250 für AdE7 bzw. einer MOI von 300 für AdL1p und AdL1p/E7. Als Kontrolle wurde eine Gruppe von Mäusen subkutan mit dem Peptid-Vakzin immunisiert. Zehn Tage nach der Immunisierung wurde die Milz isoliert und die H-2D^b- sowie A2.1-restringierte HPV-16 E7- bzw. L1-spezifische Effektor-T-Zellantwort durch den *ex vivo* IFN γ -ELISPOT bestimmt.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse zur Untersuchung der direkten zellulären Effektor-T-Zellantwort gezeigt, daß dendritische Zellen nach der Infektion mit AdE7 eine durch das murine H-2D^b-restringierte E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort induzieren können. Die Stärke der induzierten Effektorantwort war dabei von der für die Infektion der dendritischen Zellen verwendeten MOI sowie von der Stabilität des Antigens abhängig. Gegenüber der H-2D^b-restringierten Immunantwort konnte in dem A2.1K^b-transgenen Modell nach Immunisierung mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen nur die Initiation einer schwachen, nicht signifikanten A2.1-restringierte Effektorantwort gegen das E7 CTL-Epitop 597 bzw. für das L1 CTL-Epitop nachgewiesen werden. Die Ergebnisse für die A2.1-restringierten HPV-16 CTL-Epitope lassen sich wahrscheinlich auf die generell schwache A2.1-spezifischen Immunantwort zurückführen, die auf die geringe Frequenz an A2.1-spezifischen T-Zellen in diesem Mausmodell beruhen könnte³⁰⁶. Für das CTL-Epitop 597 kann aber auch die Mutation in AdE7 als mögliche Ursache nicht

ausgeschlossen werden. Im folgenden wurde die Induktion einer HPV-16-spezifischen *memory* T-Zellantwort durch die dendritischen Zellen analysiert.

3.4.2.2 Analyse der *memory* T-Zellantwort

Der Nachweis der HPV-16-spezifischen *memory* T-Zellantwort erfolgte nach dem Schema in Abb. 3.27 A für die Mäuse, die einmal immunisiert wurden, bzw. nach dem Schema in Abb. 3.27 B für die Versuche mit zwei Immunisierungen zur Untersuchung der L1-spezifischen Antikörperantwort und L1- bzw. E7-spezifischen T-Zellantwort. Die isolierten Milzzellen wurden dafür für sechs Tage *in vitro* restimuliert, um die vorhandenen HPV-16-spezifischen *memory* T-Zellen zu aktivieren und zu amplifizieren. Die induzierte HPV-16-spezifische *memory* T-Zellantwort wurde durch den CTL-Assay und den parallel durchgeführten IFN γ -ELISPOT nachgewiesen. Als Maß für die *memory* T-Zellantwort diente im IFN γ -ELISPOT die Anzahl der spezifisch für das CTL-Epitop IFN γ -sekretierenden Zellen unter 10^6 Milzzellen. bzw. im CTL-Assay die Fähigkeit zur Lyse der E7- bzw. L1-präsentierenden Targetzellen. Die Ergebnisse der CTL-Assays wurden als Prozent spezifische Lyse dargestellt, indem die Werte der nicht E7- bzw. L1-präsentierenden Kontrolltargetzellen von denen subtrahiert wurden, die das CTL-Epitop präsentierten.

Abhängigkeit der *memory* T-Zellantwort von der MOI:

Wie für die Effektor-T-Zellantwort (3.4.2.1) wurde der Einfluß unterschiedlicher MOIs von AdE7 zur Infektion der dendritischen Zellen auf die Initiation der HPV-16 E7-spezifischen *memory* T-Zellantwort untersucht. Im Vergleich zum *ex vivo* IFN γ -ELISPOT (Abb. 3.28) zeigen die in Abb. 3.30 A dargestellten Ergebnisse des IFN γ -ELISPOT spezifisch für das H-2D^b-restringierte E7 CTL-Epitop, daß die Aktivierung und Amplifikation der *memory* T-Zellen während der *in vitro* Restimulation erfolgreich war, da die Anzahl der IFN γ -sekretierenden Zellen nach Immunisierung mit dem Peptid-Vakzin von $0 \pm 2,8$ auf $3075 \pm 813,2$ zunahm. Die Infektion der dendritischen Zellen mit rekombinanten Adenoviren hatte keinen signifikanten Effekt auf die E7-spezifische *memory* T-Zellantwort (AdeGfp: $483 \pm 325,5$, Mock: $0 \pm 106,1$; $p = 0,0618$). In den Mäusen, die mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen immunisiert wurden, war die H-2D^b-restringierte E7-spezifische *memory* T-Zellantwort proportional zur verwendeten MOI von AdE7. Mit einer MOI von 250 für AdE7, war die E7-spezifische *memory* T-Zellantwort signifikant höher ($6425 \pm 106,1$; $p = 0,0016$) als mit AdeGfp-infizierten dendritischen Zellen. Im Vergleich zur Peptid-Vakzin ($3075 \pm 813,2$) war die Anzahl der E7-spezifischen IFN γ -sekretierenden Zellen mit dendritischen Zellen, die mit einer MOI von 250 für AdE7 infiziert wurden, um den Faktor 2 höher ($p = 0,0145$). Mit einer MOI von 125 für AdE7 war die E7-spezifische Immunantwort ($2012 \pm 229,8$; $p = 0,0022$) ebenfalls signifikant höher als mit AdeGfp-infizierten dendritischen Zellen und vergleichbar mit dem Ergebnis für das Peptid-Vakzin.

Die Ergebnisse des CTL-Assays (Abb. 3.30 B) bestätigten die Resultate des IFN γ -ELISPOT. Die E7-spezifische Lyse war proportional zu der verwendeten MOI von AdE7 zur Infektion der dendritischen Zellen und mit einer MOI von 250 konnte eine signifikante Lyse der 8Q-beladenen EL4.A2.1 (EL4.A2.1+8Q) bzw. der EL4.E7 nachgewiesen werden. Die spezifische Zytotoxizität betrug beim 40:1 Verhältnis von Effektor zu Target für EL4.E7 $24,3 \% \pm 3,6 \%$ ($p = 0,0016$ zu AdeGfp-infizierten dendritischen Zellen) bzw.

36,8 % \pm 2,6 % ($p < 0,0001$) für EL4.A2.1 +8Q. Diese Werte waren vergleichbar zu der Lyse mit der durch dem Peptid-Vakzin induzierten Immunantwort, die beim 40:1 Verhältnis 21,1 % \pm 1 % für EL4.A2.1+8Q bzw. 28,6 % \pm 4,1 % für EL4.E7 betrug. Für dendritischen Zellen, die mit einer MOI von 125 für AdE7 infiziert wurden, konnte eine spezifische Zytotoxizität von 7,4 % \pm 2,3 % (40:1) für EL4.A2.1+8Q und 12,4 % \pm 3,6 % (40:1) für EL4.E7 nachgewiesen werden. Im Falle von EL4.A2.1+8Q war sie signifikant ($p = 0,0010$) zu Adegfp-infizierten dendritischen Zellen jedoch nicht für EL4.E7 Targetzellen ($p = 0,8284$). Dieses unerwartete Ergebnis für EL4.E7 wird auf ein bekanntes Phänomen zurückgeführt, daß auftritt, wenn eine Zelllinie für die *in vitro* Restimulation und anschließend im CTL-Assay eingesetzt wird. Während der *in vitro* Restimulation kommt es vermutlich auch zu einer unerwünschten Amplifikation gegen andere gleichzeitig auf den Stimulatorzellen präsentierten CTL-Epitop, wodurch die Zellen im anschließenden CTL-Assay sensibler gegenüber der durch die zytotoxischen T-Lymphozyten induzierten Lyse werden (persönl. Mitteilung von A. Suhrbier, QIMR). Besonders bei hohen Effektor zu Target Verhältnissen ist die unspezifische Lyse von Bedeutung und kann in den Kontrollgruppen zu artifiziell hohen Werten führen. Für das 40:1 Verhältnis wurde bei allen durchgeführten CTL-Assays für die Kontrollgruppen, die mit Mock-infizierten oder Adegfp-infizierten dendritischen Zellen immunisiert wurden, eine höhere Lyse der EL4.E7 Targetzellen gegenüber den 8Q-beladenen EL4.A2.1 beobachtet, allerdings nicht für das 10:1 Verhältnis.

Abhängigkeit der *memory* T-Zellantwort von der Stabilität des exprimierten Antigens:

Wie für die Effektor-T-Zellantwort (3.4.2.1) wurde der Einfluß der Fusion von E7mut mit L1 auch auf die E7-spezifische *memory* T-Zellantwort untersucht. Dafür wurden die dendritischen Zellen mit AdL1p/E7 (MOI 250) statt AdE7 infiziert. Durch die *in vitro* Restimulation der isolierten Milzzellen konnte die Anzahl der spezifisch für das H-2D^b-restringierte E7 CTL-Epitop IFN γ -sekretierenden Zellen pro 10⁶ Milzzellen von 5 \pm 1,4 (Abb. 3.28) auf 475 \pm 318,2 expandiert werden (Abb. 3.30 A). Diese im IFN γ -ELISPOT detektierte E7-spezifische *memory* T-Zellantwort war jedoch nicht signifikant höher ($p = 0,1972$ bzw. $p = 0,5810$) als mit Mock-infizierten bzw. Adegfp-infizierten dendritischen Zellen, was vermutlich auf die Stabilitätszunahme von E7mut durch die Fusion mit L1 in AdL1p/E7 im Vergleich zu AdE7 zurückzuführen ist.

Auch im CTL-Assay (Abb. 3.30 B) konnte durch die Immunisierung mit AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen keine signifikante spezifische Lyse der EL4.E7 Targetzellen (10,3 % \pm 0,9 % für 40:1 Verhältnis; $p = 0,6371$) im Vergleich zu Mock-infizierten dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Für die 8Q-beladenen EL4.A2.1 betrug die spezifische Zytotoxizität für das 40:1 Verhältnis 4,3 % \pm 1,4 % und war signifikant höher als mit Adegfp-infizierten dendritischen Zellen ($p = 0,0105$). Da die spezifische Lyse sehr gering war und nicht durch den sensitiveren IFN γ -ELISPOT (Abb. 3.30 A) bzw. durch die Ergebnisse nach zwei Immunisierung mit AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen (Abb. 3.31) bestätigt wurden, ist dieses Ergebnis jedoch zweifelhaft.

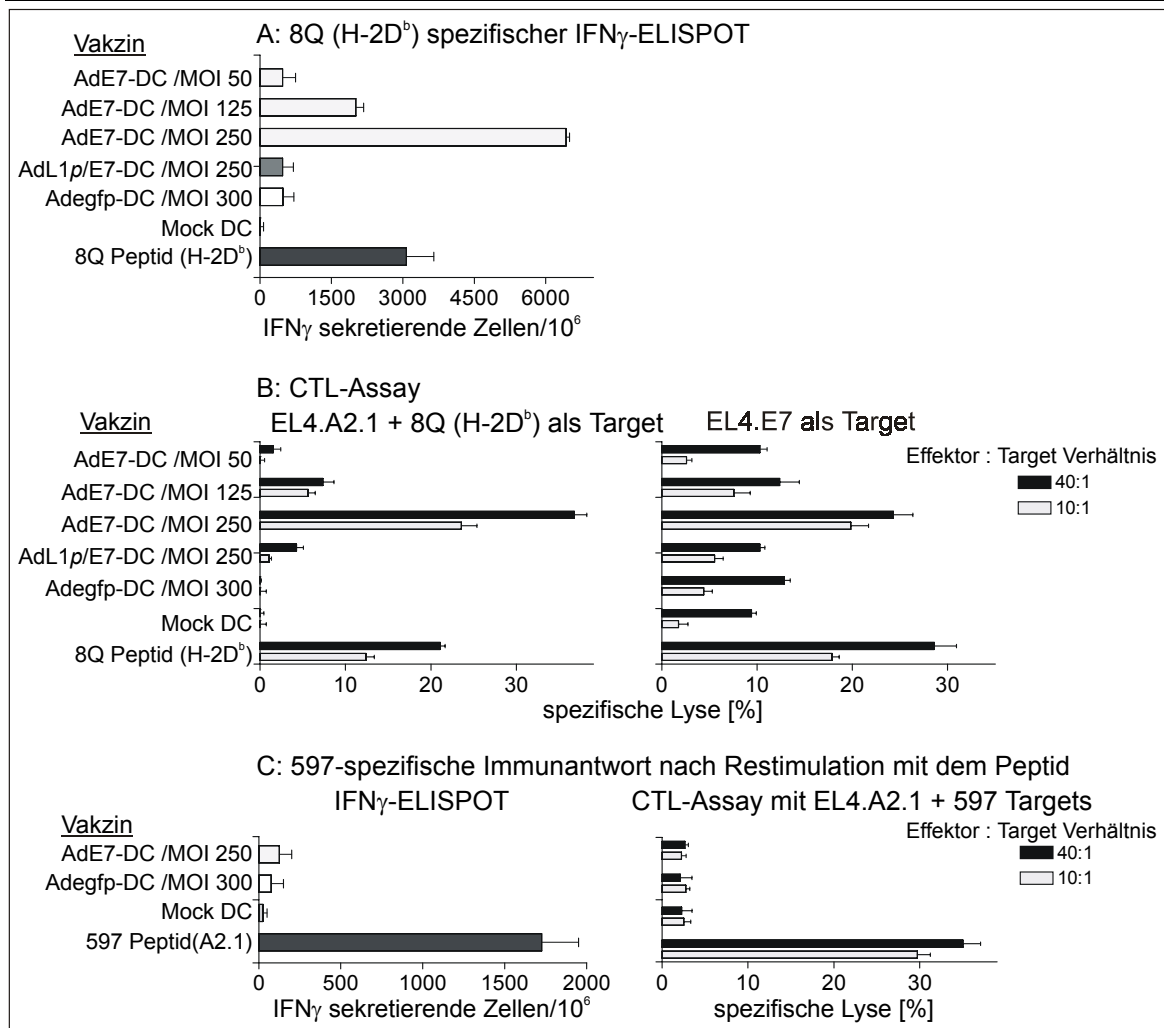


Abb. 3.30: HPV-16 E7-spezifische *memory* T-Zellantwort nach Immunisierung mit dendritischen Zellen (DC). Die A2.1K^b-transgenen Mäuse (4/Gruppe) wurden nach Abb. 3.27 A subkutan mit 5×10^5 dendritischen Zellen pro Maus immunisiert, die aus Knochenmarkszellen mit GM-CSF und IL-4 generiert wurden. Die Zellen wurden am Tag 4 mit den angegebenen adenoviralen Vektoren und der jeweiligen MOI bzw. Mock infiziert. Als Kontrolle wurde eine Gruppe von Mäusen subkutan mit dem Peptid-Vakzin immunisiert. Zehn Tage nach der Immunisierung erfolgte die sechstägige *in vitro* Restimulation der isolierten Milzzellen für das H-2D^b-restringierte CTL-Epitop nach APC-Depletion mit EL4.E7 im Verhältnis Milzzellen zu EL4.E7 von 10:1 (A, B) bzw. für 597 ohne APC-Depletion durch Zugabe des Peptides (C). Die induzierte HPV-16 E7-spezifische *memory* T-Zellantwort wurde im IFN_γ-ELISPOT und im CTL-Assay bestimmt. Die Ergebnisse des CTL-Assays sind als Prozent spezifische Lyse dargestellt, indem die Werte für die nicht E7-präsentierende EL4.A2.1 Targetzellen von den Werten der Targetzellen, die das CTL-Epitop präsentierten, subtrahiert wurde. Die spontane ⁵¹Cr-Freisetzung der Targetzellen war < 10 %.

A2.1-restringierte *memory* T-Zellantwort gegen E7:

Neben der H-2D^b-restringierten wurde auch die A2.1-restringierte E7-spezifische *memory* T-Zellantwort untersucht. Da für 597 die zelluläre *in vitro* Restimulation nicht etabliert werden konnte (Abb. 3.26 B), wurden die isolierten Milzzellen parallel nach beiden Methoden mit 597-beladenen EL4.A2.1 bzw. durch Zugabe des Peptides *in vitro* restimuliert. Für die Analyse der 597-spezifischen *memory* T-Zellantwort nach Immunisierung mit dendritischen Zellen konnte kein Unterschied zwischen den beiden Restimulationsmethoden beobachtet werden. In Abb. 3.30 C sind nur die Ergebnisse des IFN_γ-ELISPOTs und des CTL-Assay nach *in vitro* Restimulation ohne APC-Depletion durch Zugabe des

597-Peptides dargestellt, da unter diesen Bedingungen eine 597-spezifische *memory* T-Zellantwort nach Immunisierung mit dem Peptid demonstriert werden konnte, obwohl zuvor eine direkte Effektor-T-Zellantwort (Abb. 3.28) nicht nachgewiesen werden konnte. Die Anzahl der 597-spezifischen IFN γ -sekretierenden Zellen pro 10⁶ Milzzellen war nach Immunisierung mit dem 597-Peptid im IFN γ -ELISPOT mit $1725 \pm 318,2$ signifikant höher ($p = 0,0011$) als mit Mock-infizierten dendritischen Zellen ($25 \pm 35,4$). Damit wurde ausgehend von der Effektor-T-Zellantwort im *ex vivo* IFN γ -ELISPOT (Abb. 3.28) durch die Restimulation eine Erhöhung der IFN γ -sekretierenden Zellen um den Faktor 276 erzielt. Auch die spezifische Lyse der 597-beladenen EL4.A2.1 Targetzellen im CTL Assay war mit $35,0 \% \pm 3,6 \%$ (40:1 Verhältnis) signifikant höher ($p = 0,0001$) als mit Mock-infizierten dendritischen Zellen ($2,3 \% \pm 3,6 \%$). Dies zeigt, daß die Amplifikation der A2.1-spezifischen T-Zellen durch die *in vitro* Restimulation in diesem Mausmodell notwendig ist, um die 597-spezifische Immunantwort eindeutig nachzuweisen. Die Frequenz der A2.1-spezifischen T-Zellen ist zu gering für den direkten Nachweis der Effektor-T-Zellantwort (3.4.2.1). Auch nach der *in vitro* Restimulation war die durch das 597-Peptid induzierte Anzahl an 597-spezifischen IFN γ -sekretierenden Zellen noch immer um den Faktor 2 geringer als die durch das 8Q-Peptid induzierte *memory* T-Zellantwort gegen E7 (Abb. 3.30 A), so daß dieses Mausmodell nur bedingt für die Untersuchung A2.1-restringierter T-Zellantworten geeignet ist.

Mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen konnte weder im IFN γ -ELISPOT ($125 \pm 106,1$; $p = 0,8370$) noch im CTL-Assay (beim 40:1 Verhältnis: $2,7 \% \pm 0,7 \%$; $p = 0,9336$) eine 597-spezifische *memory* T-Zellantwort nachgewiesen werden, die signifikant höher war als mit AdeGFP-infizierten dendritischen Zellen (IFN γ -ELISPOT: $75 \pm 106,1$; CTL-Assay: $2,1 \% \pm 2,4 \%$). Da auch nach der *in vitro* Restimulation mit Peptid-beladenen EL4.A2.1 keine signifikante 597-spezifische T-Zellantwort detektierbar war, scheint neben der geringen Frequenz an A2.1-spezifischen T-Zellen auch die Mutation von 597 in E7mut (Abb. 3.24) als Ursache möglich. Insbesondere, da die Prozessierung dieses CTL-Epitopes durch das murine Proteasom nach Immunisierung mit dem E7-Protein gezeigt wurde (Abb. 3.26 C).

In einigen Experimenten wurde nach Immunisierung mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen und *in vitro* Restimulation mit 598-beladenen EL4.A2.1 auch die Initiation einer A2.1-restringierten *memory* T-Zellantwort gegen das E7 CTL-Epitop 598 untersucht. Wie für 597 konnte jedoch weder im IFN γ -ELISPOT noch im CTL-Assay eine eindeutige *memory* T-Zellantwort gegen dieses A2.1-restringierte CTL-Epitop nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte wie auch für die anderen A2.1-restringierten CTL-Epitope auf der geringen Frequenz an A2.1-spezifischen T-Zellen in dem Modell beruhen. Aber auch die fehlende Prozessierung von 598 kann nicht ausgeschlossen werden, da die Nutzung dieses Epitopes als natürliches aus E7 prozessiertes CTL-Epitop fraglich ist³⁰⁷ (persönl. Mitteilung von R. Tindle, SASVRC).

Für die gleichzeitige Initiation einer HPV-16 E7- und L1-spezifischen T-Zellantwort sowie einer L1-spezifischen Antikörperantwort durch die Immunisierung mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen wurde der Standardversuchsablauf (Abb. 3.27 A) wie in Abb. 3.27 B dargestellt verändert, und die A2.1K^b-transgenen Mäuse zweimal subkutan

oder intramuskulär (siehe Abb. 3.31) mit dendritischen Zellen bzw. mit dem Peptid-Vakzin immunisiert. Die Infektion der dendritischen Zellen erfolgte für AdE7 mit einer MOI von 250 und für AdL1p bzw. AdL1p/E7 mit einer MOI von 300. Nach der sechstägigen *in vitro* Restimulation der isolierten Milzzellen wurde die Effizienz von AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen zur Initiation einer L1- bzw. E7-spezifischen *memory* T-Zellantwort mit der von AdE7- bzw. AdL1p-infizierten dendritischen Zellen im IFN γ -ELISPOT und im CTL-Assay verglichen.

Abhängigkeit der *memory* T-Zellantwort von einer zweiten Immunisierung:

Die Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs zur Untersuchung der H-2D^b-restringierten E7-spezifischen *memory* T-Zellantwort nach zwei Immunisierungen sind in Abb. 3.31 A dargestellt. Die Anzahl der E7-spezifischen IFN γ -sekretierenden Zellen pro 10⁶ Milzzellen mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen war signifikant höher ($3250 \pm 212,2$; $p < 0,0001$) als nach der subkutanen ($52 \pm 19,8$) bzw. intramuskulären Immunisierung mit AdL1p-infizierten dendritischen Zellen ($50 \pm 0,0$). Auch in den Mäusen, die zusätzlich zu der subkutanen Immunisierung mit AdE7-infizierten Zellen noch intramuskulär mit AdL1p-infizierten dendritischen Zellen immunisiert wurden, war die E7-spezifische *memory* T-Zellantwort signifikant höher als mit AdL1p-infizierten dendritischen Zellen ($p < 0,0001$).

Wie nach einer Immunisierung (Abb. 3.30) konnte auch nach einer zweiten Immunisierung mit AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen keine signifikant höhere H-2D^b-restringierten *memory* T-Zellantwort gegen E7 ($50 \pm 0,0$; $p = 0,4502$) wie mit AdL1p-infizierten dendritischen Zellen nachgewiesen werden, was vermutlich auf die Stabilitätszunahme von E7mut durch die Fusion mit L1 zurückgeht.

Obwohl nach Immunisierung mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen die Effektor-T-Zellantwort um den Faktor 5 höher war als mit dem Peptid-Vakzin (Abb. 3.29), wurde im IFN γ -ELISPOT die stärkste E7-spezifische *memory* T-Zellantwort mit dem Peptid-Vakzin ($8925 \pm 459,6$) bestimmt, die sogar signifikant höher war als mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen ($p < 0,0001$). Im Vergleich zu den Ergebnissen des *ex vivo* IFN γ -ELISPOTs (Abb. 3.29) zeigten die Ergebnisse des H-2D^b-restringierten E7-spezifischen IFN γ -ELISPOTs durch die deutliche Zunahme der IFN γ -sekretierenden Zellen eine erfolgreiche Expansion der spezifischen *memory* T-Zellen durch die *in vitro* Restimulation. Allerdings war, wie später in diesem Kapitel erläutert wird, die Erhöhung für das Peptid-Vakzin (Faktor 270) effizienter für die AdE7-infizierten dendritischen Zellen (Faktor 5).

Der parallel durchgeführte CTL-Assay (Abb. 3.31 B) bestätigte die Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs für die H-2D^b-restringierte E7-spezifische *memory* T-Zellantwort. So konnte in den Mäusen, die mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen immunisiert wurden, eine signifikante spezifische Lyse der EL4.A2.1+8Q (40:1 Verhältnis: $33 \% \pm 1,4 \%$; $p = 0,0008$) bzw. der EL4.E7 (40:1 Verhältnis: $40,9 \% \pm 1,7 \%$; $p = 0,0022$) im Vergleich zur subkutanen Immunisierung mit AdL1p-infizierten dendritischen Zellen (EL4.A2.1+8Q: $7 \% \pm 1,8 \%$; EL4.E7: $12,2 \% \pm 2 \%$) nachgewiesen werden. Bei gleichzeitiger subkutaner Immunisierung mit AdE7-infizierten Zellen und intramuskulärer Immunisierung mit AdL1p-infizierten dendritischen Zellen war die E7-spezifische Zytotoxizität ebenfalls signifikant höher (EL4.A2.1+8Q: $34,4 \% \pm 1,7 \%$; $p = 0,0004$ bzw. der EL4.E7: $35,7 \% \pm$

2,7 %; $p = 0,0036$ für 40:1 Verhältnis). Für AdL1p/E7-infizierte dendritische Zellen konnte keine signifikant höhere spezifische Lyse von EL4.A2.1+8Q (40:1 Verhältnis: $12,5 \% \pm 1,9 \%$; $p = 0,0955$) oder von EL4.E7 (40:1 Verhältnis: $17,8 \% \pm 1,9 \%$; $p = 0,1420$) im Vergleich zu AdL1p-infizierten dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Die durch das Peptid-Vakzin induzierte *memory* T-Zellantwort betrug im CTL-Assay beim 40:1 Verhältnis $47,2 \% \pm 7,8 \%$ ($p = 0,0026$ zu AdL1p-infizierten dendritischen Zellen) für EL4.A2.1+8Q bzw. $47,7 \% \pm 3 \%$ ($p = 0,0009$) für EL4.E7.

Das zuvor erwähnte Phänomen der erhöhten Zytotoxizitätswerte für die endogen E7-exprimierenden EL4.E7, die auch für die *in vitro* Restimulation verwendet wurden, konnte auch in diesem Versuchen beobachtet werden, und ist wahrscheinlich auf die während der *in vitro* Restimulation unerwünschte Amplifikation von T-Zellen zurückzuführen, die andere auf den Stimulatorzellen präsentierte CTL-Epitope erkennen als die HPV-16-spezifischen CTL-Epitope.

A2.1-restringierte *memory* T-Zellantwort gegen das L1 CTL-Epitop:

Die Ergebnisse zur Untersuchung der A2.1-restringierte *memory* T-Zellantwort gegen HPV-16 L1 sind in Abb. 3.31 C dargestellt. Da die zelluläre *in vitro* Restimulation in den Vorversuchen nicht etabliert werden konnte (Abb. 3.26 B), wurden beide Restimulationsmethoden (mit L1-beladenen EL4.A2.1 bzw. durch Zugabe des Peptide) parallel durchgeführt. In Abb. 3.31 C sind die Ergebnisse des IFN γ -ELISPOTs und CTL-Assays nach *in vitro* Restimulation ohne APC-Depletion durch Zugabe des L1-Peptides dargestellt, denn so konnte die erfolgreiche Expansion der L1-spezifischen *memory* T-Zellen in der Gruppe demonstriert werden, die mit dem Peptid-Vakzin immunisiert wurden. Obwohl keine Effektor-T-Zellantwort nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.29), wurde durch die Immunisierung mit dem Peptid-Vakzin eine signifikant höhere L1-spezifischen *memory* T-Zellantwort im IFN γ -ELISPOT mit $2375 \pm 35,4$ ($p < 0,0001$) IFN γ -sekretierenden Zellen pro 10^6 Milzzellen im Vergleich zu AdE7-infizierten dendritischen Zellen ($0 \pm 35,4$) detektiert. Damit ergab sich zu den Ergebnissen des *ex vivo* IFN γ -ELISPOTs (Abb. 3.29) für das Peptid-Vakzin eine Erhöhung der spezifisch für L1 IFN γ -sekretierenden Zellen um den Faktor 790. Im CTL-Assay konnte ebenfalls eine eindeutige L1-spezifische *memory* T-Zellantwort mit dem Peptid-Vakzin gezeigt werden. So war die spezifische Lyse der EL4.A2.1+L1 Targetzellen mit $30,5 \% \pm 4,3 \%$ (40:1 Verhältnis; $p = 0,0004$) signifikant höher als mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen (40:1 Verhältnis: $0,0 \% \pm 1,0 \%$). Diese Ergebnisse für das Peptid-Vakzin demonstrieren die geringe Frequenz an A2.1-spezifischen T-Zellen, die für den Nachweis einer direkte Effektor-T-Zellantwort zu gering ist. Um eine A2.1-restringierte Immunantwort in diesem Mausmodell eindeutig nachzuweisen, ist die *in vitro* Restimulation notwendig. Daß sich das A2.1K^b-transgene Mausmodell nur bedingt für die Untersuchung A2.1-restringierter T-Zellantworten eignet, zeigte ebenso der Vergleich mit dem IFN γ -ELISPOT für die E7-spezifische *memory* T-Zellantwort nach der Immunisierung mit dem 8Q-Peptid (Abb. 3.31 A), da auch nach der *in vitro* Restimulation die Anzahl an IFN γ -sekretierenden Zellen spezifisch für L1 um den Faktor 3,5 geringer war als für 8Q.

Durch die zweimalige subkutane Immunisierung mit AdL1p-infizierten dendritischen Zellen, konnte die Initiation einer schwachen L1-spezifischen *memory* T-Zellantwort im IFN γ -ELISPOT ($175 \pm 35,4$; $p = 0,8370$) detektiert werden (Abb. 3.31 C), die jedoch nicht

signifikant höher war als mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen. Ebenso war die spezifische Lyse der EL4.A2.1+L1 Targetzellen beim 40:1 Verhältnis mit $2,5 \% \pm 4,1 \%$ gering und nicht signifikant ($p = 0,2984$). Dagegen konnte durch die zweimalige intramuskuläre Immunisierung mit AdL1p-infizierten dendritischen Zellen eine signifikante L1-spezifische *memory* T-Zellantwort im IFN γ -ELISPOT ($450 \pm 70,7$; $p = 0,0048$) im Vergleich zu AdE7-infizierten dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Allerdings konnte dieses Ergebnis nicht durch den CTL-Assay bestätigt werden, da die L1-spezifische Lyse der EL4.A2.1+L1 (40:1 Verhältnis: $1,7 \% \pm 1,5 \%$; $p = 0,1679$) nicht signifikant war. Das Ergebnis des IFN γ -ELISPOTs mit AdL1p-infizierten dendritischen Zellen konnte aber durch das Ergebnis der Gruppe bestätigt werden, die intramuskulär mit AdL1p-infizierten Zellen und subkutan mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen immunisiert wurden. In dieser Gruppe war die L1-spezifische *memory* T-Zellantwort im IFN γ -ELISPOT signifikant höher ($212 \pm 17,7$; $p = 0,0292$) als nach Immunisierung mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen. Die spezifische Lyse im CTL-Assay war auch hier nicht signifikant (40:1 Verhältnis: $1,5 \% \pm 0,7 \%$; $p = 0,3834$).

Daß die Initiation einer L1-spezifischen *memory* T-Zellantwort nicht von der intramuskulären Immunisierung mit AdL1p-infizierten dendritischen Zellen abhing, zeigte die subkutane Immunisierung mit AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen (Abb. 3.31 C). In diesem Fall war die Anzahl der L1-spezifischen IFN γ -sekretierenden Zellen signifikant höher ($525 \pm 141,4$; $p = 0,0263$) als mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen jedoch nicht im CTL-Assay (40:1 Verhältnis: $3 \% \pm 1,4 \%$; $p = 0,1044$).

Die Ergebnisse zur Untersuchung der L1-spezifischen *memory* T-Zellantwort zeigen, daß durch die Immunisierung mit L1-exprimierenden dendritischen Zellen die Initiation einer A2.1-restringierten Immunantwort gegen L1 im sensitiveren IFN γ -ELISPOT nachweisbar war. Im Vergleich zu dem Peptid-Vakzin war die Stärke der T-Zellantwort jedoch deutlich geringer, so daß dieser Ergebnis nicht allein auf die geringe Frequenz an A2.1-spezifischen T-Zellen zurückgehen kann. Da bei der Immunisierung mit dem L1-Peptid keine Prozessierung notwendig ist, könnte auch eine ineffiziente Prozessierung des A2.1-restringierten CTL-Epitopes aus L1 bzw. L1/E7 durch das murine Proteasom die schwache Immunantwort nach der Immunisierung mit L1-exprimierenden dendritischen Zellen erklären. Auch die möglicherweise bei einem *in vivo* exprimierten Antigen effizientere zelluläre *in vitro* Restimulation (siehe 3.4.1), die nicht etabliert werden konnte (Abb. 3.26 A, B), kann als Ursache nicht ausgeschlossen werden.

In vitro Restimulation:

Bei einer genaueren Betrachtung der Ergebnisse zur Untersuchung der HPV-16-spezifischen *memory* T-Zellantwort fiel im Vergleich zu der direkt gemessenen Effektor-T-Zellantwort (3.4.2.1) auf, daß in 7 von 8 durchgeführten Experimenten in den mit dem Peptid-Vakzin-immunisierten Gruppen die Amplifikation der spezifischen T-Zellen während der sechstägigen *in vitro* Restimulation effizienter erfolgte als nach Immunisierung mit dendritischen Zellen. So war die induzierte E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort im *ex vivo* IFN γ -ELISPOT nach Immunisierung mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen in allen Experimenten vergleichbar (Abb. 3.28, dendritische Zellen infiziert mit einer MOI von 125 für AdE7) bzw. besser (Abb. 3.29) als mit dem Peptid-Vakzin. Die anschließende Untersuchung der E7-spezifischen *memory* T-Zellantwort im IFN γ -ELISPOT spiegelte

jedoch unabhängig von der Restimulationsmethode (zellulär oder durch Zugabe des Peptides) dieses Ergebnis des *ex vivo* IFN γ -ELISPOTs nicht wieder. Abgesehen von einer Ausnahme (siehe Abb. 3.30 A, dendritische Zellen infiziert mit einer MOI von 250 für AdE7) war die nachgewiesene *memory* T-Zellantwort in den Mäusen, die mit dem Peptid immunisiert wurden, höher als mit dendritischen Zellen. Bei der Auswertung der *ex vivo* IFN γ -ELISPOTs wurden bei Milzzellen, die aus Peptid-immunisierten Mäusen isoliert wurden, in Abwesenheit des untersuchten CTL-Epitops (exemplarisch in Abb. 3.37 D zu sehen) nur wenige bis keine IFN γ -sekretierende Zellen detektiert. Wenn die Mäuse mit dendritischen Zellen immunisiert wurden, nahm die Anzahl der unspezifisch IFN γ -sekretierenden Zellen zu, wobei die Infektion mit adenoviralen Vektoren zu einer weiteren Zunahme führte, unabhängig davon, ob die dendritischen Zellen das Antigen exprimierten oder nicht (Abb. 3.37 A, D). Somit scheinen dendritische Zellen neben der HPV-16-spezifischen Immunantwort auch eine eher unspezifische Immunantwort zu induzieren, die z.B. auf FCS-spezifischen Epitopen beruhen könnte. Die unspezifische Immunantwort könnte die HPV-16-spezifische Antigenstimulation während der *in vitro* Restimulation reduzieren, da die Stimulatorzellen neben der HPV-16-spezifischen auch durch die unspezifische Immunantwort lysiert werden. Die unterschiedliche Restimulationseffizienz für das Peptid-Vakzin und dendritische Zellen könnte auf der induzierten unspezifischen Immunantwort beruhen.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der HPV-16-spezifischen *memory* T-Zellantwort haben gezeigt, daß dendritische Zellen infiziert mit AdE7 eine H-2D^b-restringierte *memory* T-Zellantwort gegen E7 induzieren können. Wie die direkte Effektorantwort war auch die *memory* T-Zellantwort von der verwendeten MOI von AdE7 für die Infektion der dendritischen Zellen sowie von der Stabilität des exprimierten Antigens abhängig. Die Initiation einer signifikanten E7-spezifischen *memory* T-Zellantwort restringiert durch A2.1K^b konnte nicht nachgewiesen werden. Jedoch konnte nach zwei Immunisierungen mit AdL1p- bzw. AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen eine signifikante A2.1-restringierte *memory* T-Zellantwort spezifisch für L1 im IFN γ -ELISPOT nachgewiesen werden. Für die gleichzeitige Initiation einer E7- und L1-spezifischen *memory* T-Zellantwort scheint die getrennte Infektion der dendritischen Zellen mit AdE7 und AdL1p vorteilhaft. Auch nach zwei Immunisierungen mit AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen war die E7-spezifische T-Zellantwort noch schwächer als mit AdE7-infizierten Zellen. Dieser Unterschied ist vermutlich auf die Stabilitätszunahme von E7mut durch die Fusion mit L1 in AdL1p/E7 zurückzuführen.

Die Probleme mit dem Nachweis einer A2.1-restringierten *memory* T-Zellantwort könnten auf die geringe Frequenz an A2.1-spezifischen T-Zellen sowie auf eine ineffizientere Prozessierung der A2.1-restringierten CTL-Epitope in der A2.1K^b-transgenen Maus beruhen. Im Falle von E7 ist jedoch auch die in E7mut vorkommende Mutation des A2.1-restringierten CTL-Epitops 597 zu berücksichtigen. Aber auch technische Probleme, wie die durch die dendritischen Zellen induzierte unspezifische Immunantwort, die nicht optimalen Restimulationsbedingungen und die nicht etablierte zelluläre Restimulation für die A2.1-restringierten CTL-Epitope 597 und L1, könnten erklären, warum die A2.1-spezifische Immunantwort nach Immunisierung mit genetisch modifizierten

dendritischen Zellen nicht so eindeutig nachweisbar war wie für das H-2D^b-restringierte E7 CTL-Epitop.

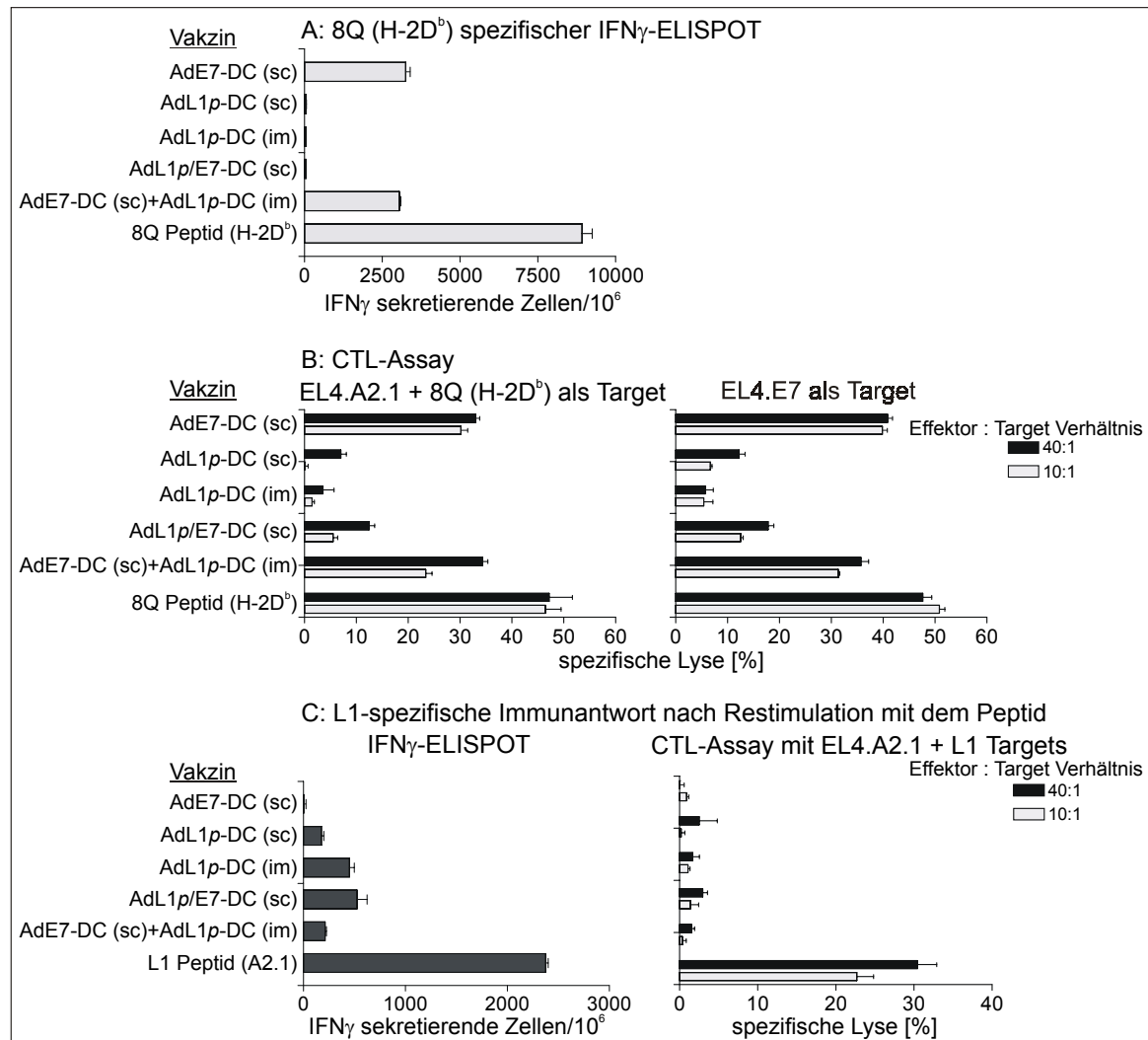


Abb. 3.31: HPV-16 E7- bzw. L1-spezifische memory T-Zellantwort nach Immunisierung mit dendritischen Zellen (DC). Die A2.1K^b-transgenen Mäuse (4/Gruppe) wurden, wie in Abb. 3.27 B dargestellt, zweimal subkutan (sc) und/oder intramuskulär (im) mit 5x10⁵ dendritischen Zellen/Maus immunisiert, die aus Knochenmarkszellen mit GM-CSF und IL-4 generiert wurden. Am Tag 4 nach der Isolation wurden die dendritischen Zellen mit AdE7 (MOI 250), AdL1p (MOI 300) bzw. AdL1p/E7 (MOI 300) infiziert. Kontrollmäusen wurden subkutan mit dem Peptid-Vakzin immunisiert. Zehn Tage nach der Immunisierung erfolgte die sechstägige *in vitro* Restimulation der isolierten Milzzellen für das H-2D^b-restringierte E7 CTL-Epitop nach APC-Depletion mit EL4.E7 im Verhältnis Milzzellen zu EL4.E7 von 10:1 (A, B) bzw. für das L1 CTL-Epitop ohne APC-Depletion durch Zugabe des Peptides (C). Die induzierte HPV-16-spezifische memory T-Zellantwort wurde im IFN_γ-ELISPOT und im CTL-Assay bestimmt. Die Ergebnisse des CTL-Assays sind als Prozent spezifische Lyse dargestellt, indem die Werte für die nicht E7-präsentierenden EL4.A2.1 Targetzellen von den Werten der Targetzellen, die das CTL-Epitop präsentierten, subtrahiert wurden. Die spontane ⁵¹Cr-Freisetzung der Targetzellen war < 10 %.

3.4.2.3 HPV-16 L1-spezifische Antikörperantwort

Für den Nachweis der Induktion einer L1-spezifischen Antikörperantwort durch die Immunisierung mit HPV-16 L1- bzw. L1/E7-exprimierenden dendritischen Zellen, die zu einem Schutz vor der Infektion bzw. Re-Infektion mit HPV-16 führt, wurden die A2.1K^b-transgenen Mäuse nach dem Schema in Abb. 3.27 B immunisiert. Serum aus den

immunisierten Mäuse wurde im HPV-16 L1-VLP ELISA auf die Anwesenheit L1-spezifischer Antikörper untersucht.

Mit den adenoviralen Vektoren, die HPV-16 Sequenzen codieren, standen für die Infektion der dendritischen Zellen zwei Wege zur Verfügung. Mit AdL1p/E7 stand ein Konstrukt zur direkten Kombination eines therapeutischen E7-Ansatzes mit prophylaktischer L1-Komponente bereit. Aber auch die Koinfektion mit AdE7 und AdL1p war möglich. Beide Wege zur genetischen Modifikation der dendritischen Zellen wurden durchgeführt und miteinander verglichen. AdL1p wurde für die getrennte Infektion ausgewählt, da in diesem Konstrukt noch die interne Zellkernlokalisationssequenz am C-Terminus von L1 enthalten ist. Der Transport von L1 in den Zellkern ist für die effiziente Bildung von L1-VLPs und somit für die Induktion einer effizienten neutralisierenden Antikörperantwort von Bedeutung²⁹².

Von Mercier et al.¹⁵⁹ wurde gezeigt, daß durch die intramuskuläre Immunisierung mit Adenovirus-infizierten dendritische Zellen neben einer spezifischen T-Zellantwort auch eine spezifische Antikörperantwort induziert wird. Aus diesem Grund wurde zusätzlich zu der subkutanen auch die intramuskuläre Immunisierungsrouten untersucht. Um mögliche Interferenzen der AdL1p-infizierten dendritischen Zellen mit der Initiation der E7-spezifischen T-Zellantwort zu vermeiden, wurden die Mäuse der Gruppe für den Ansatz mit zwei adenoviralen Konstrukten subkutan mit den AdE7-infizierten und intramuskulär mit den AdL1p-infizierten dendritischen Zellen immunisiert. Ein weiterer Grund zur Modifikation des Standardprotokolls (Abb. 3.27 A), das für die Initiation einer T-Zellantwort optimiert war (persönl. Mitteilung von R. Tindle, SASVRC), beruhte auf dem Ergebnis von Mercier et al.¹⁵⁹, daß die Kinetik für die Initiation der Antikörperantwort durch dendritische Zellen im Vergleich zu den anderen untersuchten Zellen zeitlich verzögert war. Erst 20 bis 25 Tage nach der Immunisierung mit den Antigen-exprimierenden dendritischen Zellen war die Antikörperantwort nachweisbar. Dieses verzögerte Kinetik wurde auf das geringere Expressionsniveau in den dendritischen Zellen zurückgeführt¹⁵⁹.

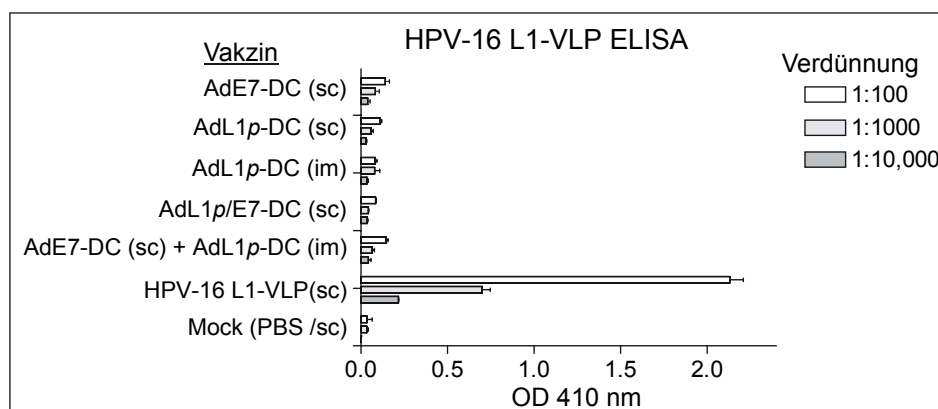


Abb. 3.32: L1-spezifische Antikörperantwort nach Immunisierung mit dendritischen Zellen (DC). Die A2.1K^b-transgenen Mäuse (4/Gruppe) wurden nach Abb. 3.27 B zweimal subkutan (sc) und/oder intramuskulär (im) mit 5×10^5 dendritischen Zellen/Maus immunisiert, die aus Knochenmarkszellen mit GM-CSF und IL-4 generiert wurden. Am Tag 4 nach der Isolation wurden die dendritischen Zellen mit AdE7 (MOI 250), AdL1p (MOI 300) bzw. AdL1p/E7 (MOI 300) infiziert. 35 Tage nach der ersten Immunisierung wurde Blut isoliert und das Serum im HPV-16 L1-VLP ELISA untersucht. Als Kontrolle wurden Mäuse subkutan mit PBS (Mock) bzw. 10 µg HPV-16 L1-VLP/Maus immunisiert und zwei Wochen nach der ersten Immunisierung erneut immunisiert. Eine Woche nach der zweiten Immunisierung wurde Blut isoliert und das Serum analysiert.

Die Ergebnisse des HPV-16 L1-VLP ELISA (Abb. 3.32) zeigen, daß die Immunisierung mit AdL1p- bzw. AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen nicht zur Induktion einer L1-spezifischen Antikörperantwort in den Mäusen führte, die sich eindeutig von der mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen unterschied. Im Vergleich zu den mit PBS-immunisierten Mäusen (Mock) wiesen alle Gruppen, die mit dendritischen Zellen immunisiert wurden, eine etwas höhere unspezifische Bindung an die gebundenen HPV-16 L1-VLPs (von M. Müller, DKFZ) auf. In den mit HPV-16 L1-VLP-immunisierten Mäusen konnte eine eindeutige L1-spezifische Antikörperantwort nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis mit den AdL1p- bzw. AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen war unerwartet, da die Expression der HPV-16 L1-Sequenzen in den infizierten Zellen nachgewiesen worden war (Abb. 3.18). Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Expression von L1 zu gering ist, um die für die Induktion einer Antikörperantwort notwendige effiziente Bildung und Sekretion von L1-VLPs zu ermöglichen. Im Vergleich zu β -Galaktosidase, dem Modellantigen in Mercier et al.¹⁵⁹, könnte dieses Ergebnis auch auf eine geringere Immunogenität von L1 beruhen. Die Abhängigkeit von der Immunogenität des Antigens steht im Einklang mit anderen Arbeiten, in denen keine signifikante Antikörperantwort gegen das in den Adenovirus-infizierten dendritischen Zellen exprimierte Transgen nachgewiesen werden konnte³⁰⁸.

Die bisherigen Ergebnisse zur Untersuchung der HPV-16-spezifischen Immunantwort von A2.1K^b-transgenen Mäusen nach Immunisierung mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen haben gezeigt, daß eine H-2D^b-restringierte E7 spezifische Effektor- und *memory* T-Zellantwort mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen induziert werden konnte. Die T-Zellantwort war von der verwendeten MOI für AdE7 und, wie der Vergleich mit AdL1p/E7 zeigte, von der Stabilität des exprimierten Antigens abhängig. Zusätzlich zu der geringen Frequenz an A2.1-spezifischen T-Zellen in dem Mausmodell erschwerten vermutlich auch die beobachtete Aktivierung einer HPV-16-unspezifischen Immunantwort durch die dendritischen Zellen, die möglicherweise ineffizientere Prozessierung der A2.1-restringierten CTL-Epitope durch das murine Proteasom sowie die Probleme mit der zellulären *in vitro* Restimulation den Nachweis einer A2.1-restringierten T-Zellantwort. Für die nicht nachweisbare 597-spezifische T-Zellantwort könnte aber auch die Mutation in E7mut von Bedeutung gewesen sein. Trotz dieser Probleme konnte durch die Immunisierung mit AdL1p- bzw. AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen die Initiation einer signifikanten A2.1-restringierten *memory* T-Zellantwort gegen HPV-16 L1 im IFN γ -ELISPOT nachgewiesen werden. Die Induktion einer L1-spezifischen Antikörperantwort durch die Immunisierung mit AdL1p- oder AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen konnte nicht beobachtet werden, obwohl die L1-Sequenzen exprimiert wurden.

Die Möglichkeit die Immunisierungseffizienz der dendritischen Zellen zur Initiation einer H-2D^b-restringierten T-Zellantwort gegen E7 durch den Transfer von kostimulatorischen Molekülen wurde im nächsten Kapitel untersucht.

3.5 Einfluß des Transfers von kostimulatorischen Molekülen auf die HPV-16 E7-spezifische Immunantwort

In den folgenden Versuchen sollte der Einfluß kostimulatorischen Moleküle auf die durch die Immunisierung mit dendritischen Zellen induzierte HPV-16 E7-spezifische T-Zellantwort untersucht werden. Die kostimulatorischen Moleküle gehören zu der TNF- bzw. TNFR-Superfamilie und sind bei der Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen (Abb. 1.4) und der daraus resultierenden Immunantwort von Bedeutung (siehe 1.4). Daher wurden ihr Einfluß auf die immunstimulatorische Eigenschaft von dendritischen Zellen näher untersucht.

Die Ergebnisse der Immunisierungsversuche (3.4.2) haben gezeigt, daß die dendritischen Zellen nach Infektion mit AdE7 eine direkte Effektor- und *memory* T-Zellantwort spezifisch für das H-2D^b-restringierte E7 CTL-Epitop *in vivo* induzierten. Durch die Koinfektion der dendritischen Zellen mit AdE7 und den adenoviralen Vektoren für die kostimulatorischen Moleküle wurde kontrolliert, ob der Effekt der kostimulatorischen Moleküle auf die Differenzierung der dendritischen Zellen und der Expression von CD80 und CD86 (siehe 3.3.3), auch einen nachweisbaren *in vivo* Effekt auf die Initiation einer HPV-16 E7-spezifischen Immunantwort hat. Da die H-2D^b-restringierte T-Zellantwort in dem verwendeten Mausmodell am stärksten war, wurde der Einfluß des Transfers der kostimulatorischen Moleküle auf die Initiation einer H-2D^b-restringierten E7-spezifischen T-Zellantwort nach dem Schema in Abb. 3.27 A analysiert.

3.5.1 Effekt von 4-1BBL auf die Immunantwort

Durch 4-1BBL konnte in den infizierten dendritischen Zellen die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie von MHC II erhöht werden (Abb. 3.22) und damit der Differenzierungsgrad der dendritischen Zellen positiv beeinflusst werden. Um zu untersuchen, ob der Effekt von 4-1BBL auf die dendritischen Zellen auch die stimulatorische Fähigkeit der Zellen zur Initiation einer E7-spezifischen T-Zellantwort beeinflusst, wurden dendritische Zellen mit Ad4-1BBL (MOI 100) und unterschiedlichen MOIs für AdE7 koinfiziert. Durch die Kombination von Ad4-1BBL mit unterschiedlichen MOIs von AdE7 sollte die Menge des exprimierten E7 in den dendritischen Zellen variiert werden, da gezeigt wurde, daß das kostimulatorische 4-1BB/4-1BBL-Signal insbesondere unter Antigen-limitierenden Bedingungen von Bedeutung ist²¹¹.

Die Analyse der direkten Effektor-T-Zellantwort durch den *ex vivo* IFN γ -ELISPOT (Abb. 3.33 A) zeigte die bereits zuvor (siehe Abb. 3.28) beobachtete Abhängigkeit der H-2D^b-restringierten T-Zellantwort gegen E7 von der zur Infektion der dendritischen Zellen verwendeten MOI von AdE7. Die Koinfektion der dendritischen Zellen mit AdE7 und Ad4-1BBL führte zu einer signifikanten Steigerung der direkten E7-spezifischen Effektor-T-Zellantwort in den Gruppen, in denen für AdE7 nicht die MOI von 250 verwendet wurde. So nahm die Anzahl der IFN γ -sekretierenden Zellen/10⁶ Milzzellen bei einer MOI von 50 für AdE7 von $26,3 \pm 8,8$ auf $62,5 \pm 3,5$ ($p = 0,0032$) bzw. bei einer MOI von 125 von $40,3 \pm 2,8$ auf $381 \pm 4,2$ ($p < 0,0001$) zu. Dagegen konnte bei einer MOI von 250 für AdE7 ($237,5 \pm 10,6$) durch den Transfer von 4-1BBL ($240 \pm 14,1$; $p = 0,0613$) keine signifikante Veränderung beobachtet werden. Daß dieser Effekt auf der Expression

von 4-1BBL und nicht auf die Koinfektion bzw. der Zunahme an adenoviralen Partikeln zurückzuführen war, demonstrierte die E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort nach Immunisierung mit dendritischen Zellen, die mit AdE7 (MOI 125) und Adegfp (MOI 600) koinfiziert wurden. Die Immunisierung mit AdE7/Adegfp-koinfizierten dendritischen Zellen führte nicht zu einer signifikant höheren E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort ($48 \pm 0,0$; $p = 0,2029$) im Vergleich zu AdE7-infizierten dendritischen Zellen.

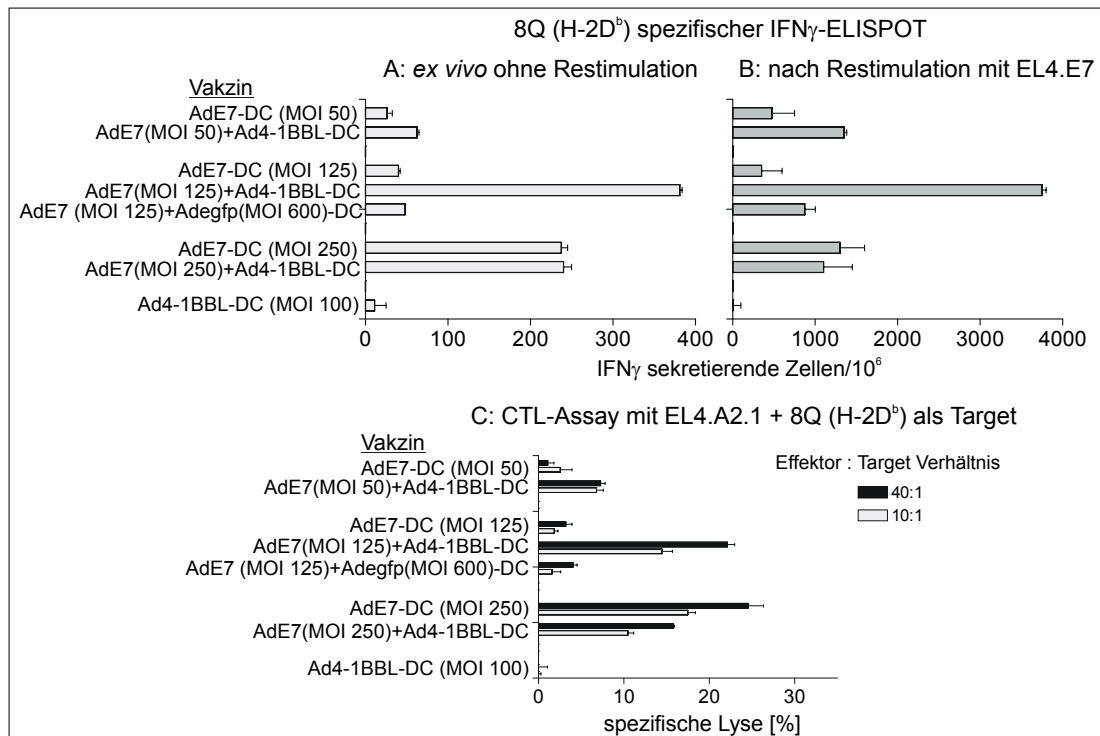


Abb. 3.33: Einfluß der Expression von 4-1BBL auf die durch dendritische Zellen (DC) induzierte HPV-16 E7-spezifische T-Zellantwort. Die A2.1K^b-transgenen Mäuse (4/Gruppe) wurden nach Abb. 3.27 A subkutan mit 5×10^5 dendritischen Zellen/Maus immunisiert, die aus Knochenmarkszellen mit GM-CSF und IL-4 generiert wurden. Die Zellen wurden am Tag 4 mit den angegebenen adenoviralen Vektoren und der jeweiligen MOI infiziert. Für Ad4-1BBL wurde immer eine MOI von 100 eingesetzt. Zehn Tage nach der Immunisierung wurden die Milzzellen isoliert und die E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort im ex vivo IFN γ -ELISPOT bestimmt (A) bzw. die Milzzellen nach APC-Depletion mit EL4.E7 im Verhältnis Milzzellen zu EL4.E7 von 10:1 für sechs Tage *in vitro* restimuliert. Die induzierte E7-spezifische *memory* T-Zellantwort wurde im IFN γ -ELISPOT (B) und im CTL-Assay (C) bestimmt. Die Ergebnisse des CTL-Assays sind als Prozent spezifische Lyse dargestellt, indem die Werte für die nicht E7-präsentierenden EL4.A2.1 Targetzellen von dem Wert der 8Q-beladenen EL4.A2.1 Targetzellen subtrahiert wurde. Die spontane ⁵¹Cr-Freisetzung der Targetzellen war < 10 %.

Die Ergebnisse der Effektor-T-Zellantwort wurden durch die Ergebnisse der E7-spezifischen *memory* T-Zellantwort im IFN γ -ELISPOTs (Abb. 3.33 B) und CTL-Assays (Abb. 3.33 C) bestätigt. Durch die Expression von 4-1BBL in den dendritischen Zellen konnte bei einer MOI von 50 für AdE7 eine Zunahme der Anzahl an IFN γ -sekretierenden Zellen/10⁶ Milzzellen spezifisch für das H-2D^b-restringierte E7 CTL-Epitop von $475 \pm 388,9$ auf $1350 \pm 42,5$ im IFN γ -ELISPOT bzw. im CTL-Assay eine signifikante Erhöhung der spezifischen Lyse der EL4.A2.1+8Q beim 40:1 Verhältnis von $1,1 \% \pm 1,3 \%$ auf $7,3 \% \pm 0,9 \%$ ($p = 0,0219$) nachgewiesen werden. Auch bei einer MOI von 125 für AdE7 war die E7-spezifische *memory* T-Zellantwort durch den Transfer von 4-1BBL signifikant höher (IFN γ -ELISPOT: $3750 \pm 70,7$; $p = 0,0002$ bzw. CTL-Assay: $22,1 \% \pm 1,5 \%$; $p = 0,0014$) als nach der Koinfektion der dendritischen Zellen mit Adegfp

(IFN γ -ELISPOT: $875 \pm 176,8$ bzw. CTL-Assay: $4,0 \% \pm 0,9 \%$). Dieser Vergleich mit Adegfp-koinfizierten dendritischen Zellen zeigte, daß die Zunahme der adenoviralen Partikel durch die Koinfektion zwar zu einer leichten Erhöhung der durch die dendritischen Zellen induzierten E7-spezifischen *memory* T-Zellantwort führte, die allerdings mit Ad4-1BBL signifikant höher war. Bei einer MOI von 250 für AdE7 konnte kein signifikanter Effekt von 4-1BBL im IFN γ -ELISPOT festgestellt werden ($1300 \pm 424,3$ zu 1100 ± 495 mit Ad4-1BBL; $p = 0,4689$). Im CTL-Assay wurde dagegen eine signifikante Abnahme der spezifischen Lyse der EL4.A2.1+8Q von $24,5 \% \pm 3,2 \%$ auf $15,8 \% \pm 0,3 \%$ ($p = 0,0194$) durch die Koinfektion mit Ad4-1BBL nachgewiesen. Ob es sich hierbei um einen inhibitorischen Effekt von 4-1BBL auf die Zytotoxizität handelt, ist unklar. Da dieses Ergebnis nicht durch den parallel durchgeführten IFN γ -ELISPOT bestätigt wurde und ein solcher Effekt von 4-1BBL nicht in der Literatur beschrieben ist, scheint dieses überraschende Ergebnis des CTL-Assays eher auf experimentelle Schwankungen zu beruhen.

Die in Abb. 3.33 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die durch den Transfer von 4-1BBL gezeigte Erhöhung der Expression von MHC II, CD80 und CD86 (Abb. 3.22) auch die immunstimulatorische Kapazität der dendritischen Zellen zur Initiation einer T-Zellantwort verbessert. Die Expression von 4-1BBL führte zu einer Steigerung der Immunisierungseffizienz von dendritischen Zellen, wenn die Menge des exprimierten Antigens suboptimal für die Initiation einer T-Zellantwort war. Dagegen hatte 4-1BBL unter optimalen Bedingungen für die Initiation einer E7-spezifischen T-Zellantwort (MOI 250 für AdE7) keinen Effekt auf immunstimulatorische Fähigkeit der dendritischen Zellen. Diese Abhängigkeit von 4-1BBL von der Menge des Antigens wird durch Tan et al.²¹¹ bestätigt. Die Zunahme der HPV-16 E7-spezifischen T-Zellantwort durch die Expression von 4-1BBL könnte auf die Erhöhung des Expressionsniveaus von CD80 und CD86 sowie der allgemeinen Verbesserung des Differenzierungszustands der dendritischen Zellen beruhen.

3.5.2 Effekt der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD40L, RANK und RANKL

Die Ergebnisse mit 4-1BBL haben gezeigt, daß besonders unter Antigen-limitierenden Bedingungen ein positiver Effekt auf die durch die dendritischen Zellen induzierte E7-spezifische T-Zellantwort zu beobachten war (siehe Abb. 3.33). Daher wurde für die *in vivo* Versuche zur Analyse von CD40, CD40L, RANK und RANKL AdE7 mit einer MOI von 125 zur Infektion der dendritischen Zellen verwendet.

Durch die Expression des TNF/TNFR-Paares RANK/RANKL in dendritischen Zellen konnte eine deutliche Zunahme des Expressionsniveaus für CD80, CD86 und MHC II gezeigt werden (Abb. 3.22). Für CD40/CD40L konnte auch eine Erhöhung der Expression von CD80 und CD80 beobachtet werden, jedoch nicht für MHC II. Ob dieser Modifikationen der dendritischen Zellen auch einen Effekt auf die stimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen besitzt, wurde durch die Initiation einer E7-spezifischen T-Zellantwort restringiert durch H-2D^b *in vivo* analysiert. Da der gleichzeitige Transfer von Rezeptor und Ligand zu einer stärkeren Aktivierung der dendritischen Zellen führte verglichen mit Ligand oder Rezeptor alleine (vergleiche Abb. 3.22 und Abb. 3.23), wurde zuerst der Einfluß des Transfers von Rezeptor und Ligand zusammen untersucht, um die

optimale Differenzierung der dendritischen Zellen sicherzustellen. Anschließend wurden die beiden TNF/TNFR-Paare kombiniert oder die endogen in T-Zellen exprimierten (AdCD40L+AdRANKL) bzw. in dendritischen Zellen exprimierten kostimulatorischen Moleküle (AdCD40+AdRANK) zusammengefaßt.

Die Kombination von AdE7 (MOI 125) mit den rekombinanten Adenoviren AdCD40 und AdCD40L (jeweils MOI 100) zur Koinfektion der dendritischen Zellen zeigte keinen Effekt auf die immunstimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen. Für die direkte H-2D^b-restringierte E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort (Abb. 3.34 A) konnte mit $82 \pm 8,5$ ($p = 0,8700$) IFN γ -sekretierenden Zellen/ 10^6 Milzzellen keine signifikante Veränderung im Vergleich zu AdE7-infizierten dendritischen Zellen ($84 \pm 28,3$) festgestellt werden. Ebenso konnte für die E7-spezifische *memory* T-Zellantwort im IFN γ -ELISPOT (Abb. 3.34 B) mit $200 \pm 212,1$ ($p = 0,7702$) IFN γ -sekretierenden Zellen/ 10^6 Milzzellen bzw. im CTL-Assay mit einer spezifischen Lyse der EL4.A2.1+8Q von $0,0 \% \pm 2,0 \%$ ($p = 0,1898$) für das 40:1 Verhältnis keine signifikante Veränderung gegenüber AdE7-infizierten dendritischen Zellen (IFN γ -ELISPOT: $100 \pm 282,8$ bzw. CTL-Assay: $3,2 \% \pm 1,3 \%$) nachgewiesen werden. Daß der Transfer von CD40/CD40L zu keinem Effekt auf die Initiation einer E7-spezifischen T-Zellantwort durch die dendritischen Zellen führte, war unerwartet, da die Transgen-Expression nach Infektion mit AdCD40 und AdCD40L gezeigt wurde (Abb. 3.14), die Mutationen in den DNA-Sequenzen für CD40 (3.2.1.1) und CD40L (3.2.1.2) beschrieben sind und nach dem Transfer von CD40 und CD40L in dendritischen Zellen ein Effekt auf die Expression von CD80 und CD86 nachweisbar war (Abb. 3.22). Die *in vivo* Ergebnisse für CD40/CD40L könnten auf den im Vergleich zu 4-1BBL bzw. RANK/RANKL geringsten Effekt auf die Expression von MHC II, CD80 und CD86 (siehe Abb. 3.22) zurückgehen. Von Fernando et al.³⁰⁹ wurde gezeigt, daß die Induktion einer H-2D^b-restringierten E7-spezifischen T-Zellantwort unabhängig von CD4⁺-T-Zellen ist. Da CD40L in CD4⁺-T-Zellen exprimiert wird¹²⁴, könnten die *in vivo* Ergebnisse mit CD40/CD40L auch auf das HPV-16 E7-Antigen zurückzuführen sein,

Im Gegensatz zu CD40/CD40L führte die Koexpression von RANK und RANKL zu einer signifikanten Erhöhung der Immunisierungseffizienz der dendritischen Zellen. Die Anzahl der E7-spezifischen IFN γ -sekretierenden Zellen/ 10^6 Milzzellen im *ex vivo* IFN γ -ELISPOT (Abb. 3.34 A) nahm von $84 \pm 28,3$ (AdE7-infizierten dendritischen Zellen) auf $190 \pm 31,3$ ($p = 0,0029$) zu. Diese Steigerung der Effektor-T-Zellantwort war auf den Transfer von RANK/RANKL zurückzuführen, da die Anzahl der IFN γ -sekretierenden Zellen spezifisch für E7 auch signifikant höher war ($p = 0,0103$) als nach Immunisierung mit AdE7/Adegfp- (MOI 600) koinfizierten dendritischen Zellen ($94 \pm 25,5$). Die Ergebnisse zur Untersuchung der E7-spezifischen *memory* T-Zellantwort bestätigten die Daten des *ex vivo* IFN γ -ELISPOT. Im E7-spezifischen IFN γ -ELISPOT (Abb. 3.34 B) konnte durch RANK/RANKL eine signifikante Erhöhung der spezifisch für E7 IFN γ -sekretierenden Zellen von $100 \pm 282,8$ (AdE7-infizierte dendritische Zellen) bzw. $875 \pm 176,8$ (AdE7/Adegfp-koinfizierte dendritische Zellen) auf $1675 \pm 35,4$ ($p = 0,0002$ bzw. $p = 0,0014$) nachgewiesen werden. Die spezifische Lyse der 8Q-beladenen EL4.A2.1 betrug für das 40:1 Verhältnis $18,8 \% \pm 3,0 \%$ ($p = 0,0009$ bzw. $p = 0,0021$) und war signifikant höher als mit AdE7-infizierten ($3,2 \% \pm 1,3 \%$) bzw. AdE7/Adegfp-koinfizierten dendritischen Zellen

(4,0 % \pm 0,9 %). Der Vergleich mit der induzierten E7-spezifischen *memory* T-Zellantwort von dendritischen Zellen, die mit AdE7 und Adegfp koinfiziert wurden, zeigte, daß die Verbesserung der stimulatorischen Eigenschaft der dendritischen Zellen nicht auf der Zunahme an Adenoviruspunkten beruhte, sondern auf der Koexpression von RANK und RANKL.

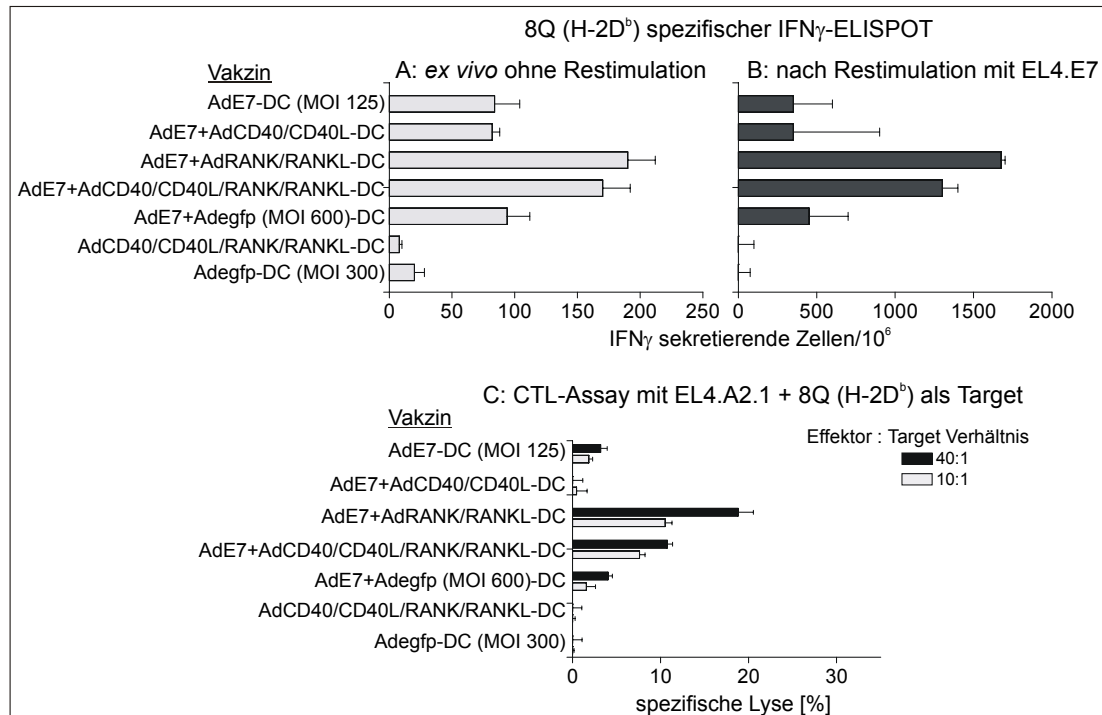


Abb. 3.34: Effekt des Transfers von CD40, CD40L, RANK und RANKL auf die durch dendritische Zellen (DC) induzierte HPV-16 E7-spezifische T-Zellantwort. Die A2.1K^b-transgenen Mäuse (4/Gruppe) wurden, wie in Abb. 3.27 A dargestellt, subkutan mit 5×10^5 dendritischen Zellen/Maus immunisiert, die aus Knochenmarkszellen mit GM-CSF und IL-4 generiert wurden. Die Zellen wurden am Tag 4 mit den angegebenen adenoviralen Vektoren und der jeweiligen MOI infiziert. Für die kostimulatorischen Vektoren wurde jeweils eine MOI von 100 verwendet. Zehn Tage nach der Immunisierung wurden die Milzzellen isoliert und die E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort im *ex vivo* IFN γ -ELISPOT bestimmt (A) bzw. die Milzzellen nach APC-Depletion mit EL4.E7 im Verhältnis Milzzellen zu EL4.E7 von 10:1 für sechs Tage *in vitro* restimuliert. Die induzierte E7-spezifische *memory* T-Zellantwort wurde im IFN γ -ELISPOT (B) und im CTL-Assay (C) bestimmt. Die Ergebnisse des CTL-Assays sind als Prozent spezifische Lyse dargestellt, indem die Werte für die nicht E7-präsentierenden EL4.A2.1 Targetzellen von dem Wert der 8Q-beladenen EL4.A2.1 Targetzellen subtrahiert wurde. Die spontane ⁵¹Cr-Freisetzung der Targetzellen war < 10 %.

Die Koinfektion der dendritischen Zellen mit AdCD40, AdCD40L, AdRANK und AdRANKL hatte auf die Expression von CD80 und CD86 einen vergleichbaren Effekt wie RANK und RANKL, jedoch war die Zunahme von MHC II geringer (Abb. 3.22 und Abb. 3.23). Dieses Ergebnis wurde durch die Kombination von AdCD40, AdCD40L, AdRANK und AdRANKL (jeweils MOI 100) mit AdE7 (MOI 125) zur Koinfektion der dendritischen Zellen durch die *in vivo* Experimente bestätigt. So war die H-2D^b-restringierte Effektor-T-Zellantwort gegen E7 im *ex vivo* IFN γ -ELISPOT (Abb. 3.34 A) mit $170 \pm 31,1$ ($p = 0,0096$ bzw. $p = 0,0192$) IFN γ -sekretierenden Zellen signifikant höher als mit AdE7-infizierten bzw. AdE7/Adegfp-koinfizierten dendritischen Zellen, und nur etwas schwächer als durch den Transfer von RANK/RANKL. Für die E7-spezifische *memory* T-Zellantwort war das Ergebnis identisch. Mit $1300 \pm 141,1$ ($p = 0,0005$ bzw. $p = 0,0075$) war die Anzahl der IFN γ -sekretierenden Zellen im IFN γ -ELISPOT (Abb. 3.34 B) und mit

10,0 % \pm 1,0 % ($p = 0,0036$ bzw. $p = 0,0015$) spezifische Zytotoxizität signifikant höher als mit AdE7-infizierten bzw. AdE7/Adegfp-koinfizierten dendritischen Zellen aber geringer als mit RANK/RANKL. Die geringere Erhöhung des stimulatorischen Potentials der dendritischen Zellen durch die Koexpression von CD40, CD40L, RANK und RANKL im Vergleich zu RANK/RANKL könnte auf eine geringere Differenzierung der dendritischen Zellen durch z.B. die größere Menge an Adenoviruspartikeln zurückgehen (siehe MHC II in Abb. 3.22 und Abb. 3.23). Aber auch ein inhibierender Effekt von CD40 und CD40L kann nicht ausgeschlossen werden.

Um zu untersuchen, ob Liganden oder Rezeptoren für diesen *in vivo* Effekt verantwortlich sind, wurden die Rezeptor/Ligandenpaare CD40/CD40L und RANK/RANKL bezüglich ihrer natürlichen Expression (T-Zellen oder dendritische Zellen), wie bei der FACS-Analyse (Abb. 3.23), gegliedert, mit AdE7 (MOI 125) zur Koinfektion der dendritischen Zellen kombiniert und die Initiation einer E7-spezifischen T-Zellantwort analysiert.

Die Untersuchung der H-2D^b-restringierten Effektor-T-Zellantwort gegen E7 durch den *ex vivo* IFN γ -ELISPOT (Abb. 3.35 A) zeigte, daß sowohl die Koexpression der endogen in T-Zellen exprimierten CD40L und RANKL als auch der endogen in dendritischen Zellen exprimierten CD40 und RANK zu einer signifikanten Erhöhung der durch die dendritischen Zellen induzierten Effektor-T-Zellantwort gegen E7 führten. So nahm die Anzahl der IFN γ -sekretierenden Zellen/10⁶ Milzzellen von $29 \pm 4,2$ für AdE7-infizierte dendritische Zellen durch den Transfer von CD40L und RANKL auf $61 \pm 1,4$ ($p = 0,0486$) bzw. für CD40 und RANK auf $92 \pm 14,1$ ($p < 0,0036$) zu. Im Vergleich zu der Koexpression von RANK/RANKL mit $145 \pm 4,3$ spezifisch für E7 IFN γ -sekretierenden Zellen war die Erhöhung der Effektor-T-Zellantwort durch die Liganden bzw. Rezeptoren geringer. Die *in vivo* Ergebnisse der Effektor-T-Zellantwort bestätigten den Effekt von CD40 und RANK bzw. CD40L und RANKL auf den Differenzierungsgrad der dendritischen Zellen und der Expression von CD80 und CD86 (siehe Abb. 3.23), der geringer war als mit RANK und RANKL (siehe Abb. 3.22).

Die E7-spezifische *memory* T-Zellantwort war durch die Koexpression von CD40L und RANKL bzw. CD40 und RANK ebenfalls signifikant höher als mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen. Die Anzahl der IFN γ -sekretierenden Zellen im IFN γ -ELISPOT (Abb. 3.35 B) erhöhte sich von $830 \pm 155,6$ auf $2612,5 \pm 583,4$ ($p = 0,0025$) für CD40L/RANKL bzw. auf $2400 \pm 424,3$ ($p = 0,0017$) für CD40/RANK. Auch die spezifische Lyse der EL4.A2.1+8Q im CTL-Assay (Abb. 3.35 C) erhöhte sich beim 40:1 Verhältnis signifikant von $7,4 \% \pm 1,4 \%$ auf $18,7 \% \pm 1,7 \%$ ($p = 0,0036$) für CD40L/RANKL bzw. auf $16,6 \% \pm 2,9 \%$ ($p = 0,0023$) für CD40/RANK. Im Gegensatz zur Effektor-T-Zellantwort konnte für die E7-spezifische *memory* T-Zellantwort kein Unterschied zwischen der Koexpression der Liganden bzw. Rezeptoren im Vergleich zu RANK/RANKL nachgewiesen werden (IFN γ -ELISPOT: $2700 \pm 106,1$; CTL-Assay: $18,8 \% \pm 3,0 \%$). Da durch die dendritischen Zellen die Aktivierung einer HPV-16-unspezifischen Immunantwort nachweisbar war (siehe Abb. 3.37), die für RANK/RANKL proportional zur Erhöhung der E7-spezifischen Effektor-T-Zellantwort zunahm, können ineffizientere Restimulationsbedingungen (siehe 3.4.2.2) für den Transfer von RANK/RANKL im

Vergleich zu CD40/RANK bzw. CD40L/RANKL als Ursache nicht ausgeschlossen werden.

Die Steigerung der Immunisierungseffizienz von dendritischen Zellen durch den Transfer der Rezeptoren bzw. Liganden könnte, insbesondere für CD40L/RANKL, auf der durch den Transfer gezeigten Zunahme der Expression von MHC II, CD80 und CD86 beruhen (Abb. 3.23). Dies könnte auch für die endogen in dendritischen Zellen exprimierten CD40 und RANK gelten. Jedoch war der Effekt von CD40/RANK auf die Expression von MHC II, CD80 und CD86 in den dendritischen Zellen geringer als für CD40L/RANKL (Abb. 3.23). Daher könnte der Einfluß von CD40/RANK auf die stimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen auch auf einem anderen Mechanismus beruhen. So könnte z.B. durch den Transfer von CD40 und RANK die Expressionsintensität dieser endogen in dendritischen Zellen exprimierten TNFR erhöht werden. In der Maus könnte dies die Effizienz der dendritischen Zellen zur Interaktion mit den Liganden-exprimierenden T-Zellen verbessern, wodurch das stimulatorische Potential der Zellen verbessert werden würde.

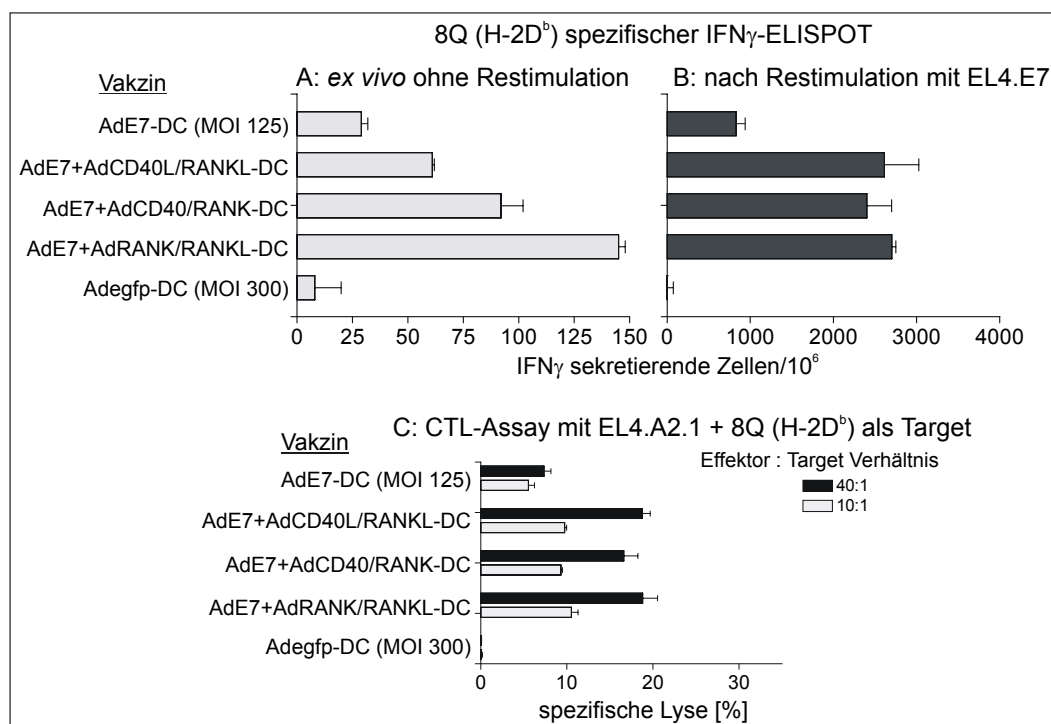


Abb. 3.35: Einfluß der in T-Zellen exprimierten kostimulatorischen Moleküle CD40L und RANKL bzw. der endogen in dendritischen Zellen (DC) exprimierten kostimulatorischen Moleküle CD40 und RANK auf die T-Zellantwort gegen HPV-16 E7 nach Immunisierung mit dendritischen Zellen. Die A2.1K^b-transgenen Mäuse (4/Gruppe) wurden nach Abb. 3.27 A subkutan mit 5×10^5 dendritischen Zellen/Maus immunisiert, die aus Knochenmarkszellen mit GM-CSF und IL-4 generiert wurden. Die Zellen wurden am Tag 4 mit den angegebenen adenoviralen Vektoren und der jeweiligen MOI infiziert. Für die kostimulatorischen Vektoren wurde jeweils eine MOI von 100 verwendet. Zehn Tage nach der Immunisierung wurden die Milzzellen isoliert und die E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort im ex vivo IFN_γ-ELISPOT bestimmt (A) bzw. die Milzzellen nach APC-Depletion mit EL4.E7 im Verhältnis Milzzellen zu EL4.E7 von 10:1 für sechs Tage *in vitro* restimuliert. Die induzierte E7-spezifische *memory* T-Zellantwort wurde im IFN_γ-ELISPOT (B) und im CTL-Assay (C) bestimmt. Die Ergebnisse des CTL-Assays sind als Prozent spezifische Lyse dargestellt, indem die Werte für die nicht E7-präsentierenden EL4.A2.1 Targetzellen von dem Wert der 8Q-beladenen EL4.A2.1 Targetzellen subtrahiert wurde. Die spontane ⁵¹Cr-Freisetzung der Targetzellen war < 10 %.

Aufgrund der Ergebnisse des Transfers von CD40 und CD40L auf die Initiation einer T-Zellantwort (Abb. 3.34) ist zu vermuten, daß der positive Effekt der Koexpression der

Liganden bzw. Rezeptoren überwiegend auf der Funktion von RANKL bzw. RANK beruht und nicht auf CD40L bzw. CD40.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD40L, RANK und RANKL auf die Initiation einer E7-spezifischen T-Zellantwort in Abb. 3.34 und Abb. 3.35 gezeigt, daß die durch die Expression gezeigte Erhöhung der Expression von MHC II, CD80 und CD86 (Abb. 3.22) auch das stimulatorische Potential der dendritischen Zellen zur Initiation einer T-Zellantwort verbessern. Durch die Koexpression von RANK und RANKL bzw. der Liganden oder Rezeptoren konnte unter Antigen-limitierenden Bedingungen eine signifikante Verbesserung der durch die dendritischen Zellen *in vivo* induzierten E7-spezifischen T-Zellantwort nachgewiesen werden. Diese Zunahme könnte für RANK/RANKL und den Liganden auf die Erhöhung des Expressionsniveaus von CD80 und CD86 sowie die allgemeine Verbesserung des Differenzierungszustands der dendritischen Zellen zurückgehen (siehe Abb. 3.22 und Abb. 3.23). Da der Einfluß des Transfers der Rezeptoren auf die Expression von MHC II, CD80 und CD86 geringer war (Abb. 3.23) als mit den Liganden bzw. RANK und RANKL, ist zu vermuten, daß auch durch die Erhöhung der Expressionsintensität der endogen in dendritischen Zellen exprimierten TNFR-Moleküle die Immunisierungseffizienz verbessert werden kann, indem z.B. die Interaktion von dendritischen Zellen mit T-Zellen *in vivo* effizienter erfolgt.

Trotz des gezeigten Einflusses des Transfers von CD40 und CD40L auf die Expression von CD80 und CD86 in dendritischen Zellen (Abb. 3.22) konnte kein Effekt auf die Initiation einer E7-spezifischen T-Zellantwort durch die dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.34). Dies könnte darauf beruhen, daß mit CD40/CD40L der geringste Effekt auf die Expression von MHC II, CD80 und CD86 beobachtet wurde und/oder daß die Induktion einer H-2D^b-restringierten E7-spezifischen T-Zellantwort unabhängig von CD4⁺-T-Zellen ist³⁰⁹.

3.5.3 Synergistischer Effekt der kostimulatorischen Moleküle 4-1BBL, RANK und RANKL

Der Transfer von 4-1BBL führte nur zur Initiation einer effizienteren E7-spezifische T-Zellantwort durch die dendritischen Zellen, wenn die Menge des exprimierten Antigens suboptimal war (Abb. 3.33). Ebenso führte die Expression von RANK und RANKL zu einer Steigerung der durch die dendritischen Zellen induzierten E7-spezifischen T-Zellantwort (Abb. 3.34). Wie für 4-1BBL wurde der Effekt von RANK/RANKL auf die immunstimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen unter Antigen-limitierenden Bedingungen nachgewiesen. Die Charakterisierung der dendritischen Zellen im FACS hat gezeigt, daß die Koexpression der drei kostimulatorischen Moleküle RANK, RANKL und 4-1BBL zusammen die stärkste Zunahme des Expressionsniveaus von MHC II, CD80 und CD86 in den dendritischen Zellen induzierte (Abb. 3.23). Daher wurde untersucht, ob die Kombination von 4-1BBL mit RANK und RANKL bei der optimalen MOI von 250 für AdE7 die durch die dendritischen Zellen induzierte E7-spezifische T-Zellantwort verstärkt.

Die Ergebnisse des *ex vivo* IFN γ -ELISPOTs zur Bestimmung der direkten H-2D^b-restringierten E7-spezifischen Effektor-T-Zellantwort sind in Abb. 3.36 A dargestellt. Die Koinfektion der dendritischen Zellen mit AdE7 (MOI 250) und Ad4-1BBL (MOI 100) bzw.

AdRANK und AdRANKL (jeweils MOI 100) führte zu keiner signifikanten Veränderung der spezifisch für E7 IFN γ -sekretierenden Zellen mit $240 \pm 14,1$ ($p = 0,0725$) bzw. $302 \pm 3,5$ ($p = 0,7783$) im Vergleich zu AdE7-infizierte dendritische Zellen ($237 \pm 10,6$). Dagegen war die Anzahl der IFN γ -sekretierenden Zellen nach Immunisierung mit dendritischen Zellen, die mit AdE7, AdRANK, AdRANKL und Ad4-1BBL koinfiziert wurden, mit $495 \pm 14,1$ ($p = 0,0081$) signifikant höher als mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen.

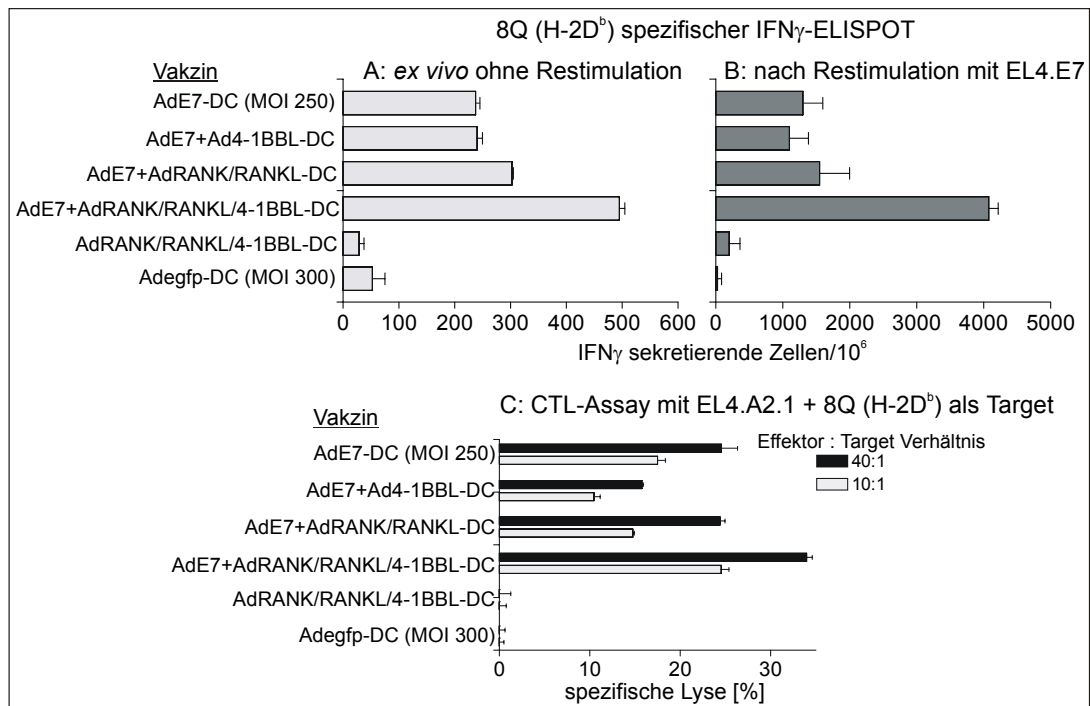


Abb. 3.36: Verstärkung der HPV-16 E7-spezifischen T-Zellantwort durch Koexpression von RANK, RANKL und 4-1BBL in dendritischen Zellen (DC). Die A2.1K^b-transgenen Mäuse (4/Gruppe) wurden nach Abb. 3.27 A subkutan mit 5×10^5 dendritischen Zellen/Maus immunisiert, die aus Knochenmarkszellen mit GM-CSF und IL-4 generiert wurden. Die Zellen wurden am Tag 4 mit den angegebenen adenoviralen Vektoren und der jeweiligen MOI infiziert. Für AdRANK, AdRANKL bzw. Ad4-1BBL wurde jeweils eine MOI von 100 verwendet. Zehn Tage nach der Immunisierung wurden die Milzzellen isoliert und die E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort im ex vivo IFN γ -ELISPOT bestimmt (A) bzw. die Milzzellen nach APC-Depletion mit EL4.E7 im Verhältnis Milzzellen zu EL4.E7 von 10:1 für sechs Tage *in vitro* restimuliert. Die induzierte E7-spezifische *memory* T-Zellantwort wurde im IFN γ -ELISPOT (B) und im CTL-Assay (C) bestimmt. Die Ergebnisse des CTL-Assays sind als Prozent spezifische Lyse dargestellt, indem die Werte für die nicht E7-präsentierenden EL4.A2.1 Targetzellen von dem Wert der 8Q-beladenen EL4.A2.1 Targetzellen subtrahiert wurde. Die spontane ⁵¹Cr-Freisetzung der Targetzellen war < 10 %.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der E7-spezifischen *memory* T-Zellantwort im IFN γ -ELISPOT (Abb. 3.36 B) und im CTL-Assays (Abb. 3.36 C) bestätigten die Resultate des ex vivo IFN γ -ELISPOTs. Durch die Koinfektion der dendritischen Zellen mit AdE7, AdRANK, AdRANKL und Ad4-1BBL konnte im IFN γ -ELISPOT eine signifikante Erhöhung der Anzahl IFN γ -sekretierender Zellen von $1300 \pm 424,3$ auf $4075 \pm 247,5$ ($p = 0,4689$) bzw. der spezifischen Lyse der EL4.A2.1+8Q von $25,5 \% \pm 3,2 \%$ auf $34,0 \% \pm 1,1 \%$ ($p = 0,0200$) für das 40:1 Verhältnis im CTL-Assay im Vergleich zu AdE7-infizierten dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Dagegen führte der Transfer von RANK und RANKL zu keiner signifikanten Veränderung der durch die dendritischen Zellen induzierten E7-spezifischen *memory* T-Zellantwort (IFN γ -ELISPOT: $1550 \pm 777,8$;

$p = 0,7415$ bzw. CTL-Assay: $24,4 \% \pm 1,0 \%$; $p = 0,9556$) im Vergleich zu AdE7-infizierten dendritischen Zellen. Im IFN γ -ELISPOT konnte durch den Transfer von 4-1BBL mit 1100 ± 495 ($p = 0,4689$) keine signifikante Veränderung der Anzahl an IFN γ -sekretierender Zellen im Vergleich zu AdE7-infizierten dendritischen Zellen beobachtet werden. Im CTL-Assay wurde dagegen mit $15,8 \% \pm 0,3 \%$ ($p = 0,0194$) eine signifikante Abnahme der spezifischen Zytotoxizität durch die Koinfektion mit Ad4-1BBL beobachtet. Da dieses Ergebnis nicht im parallel durchgeführten IFN γ -ELISPOT bestätigt wurde und in der Literatur nicht beschrieben ist, ist zu vermuten, daß es sich hierbei eher um experimentelle Schwankungen handelt als um einen inhibitorischen Effekt von 4-1BBL auf die Zytotoxizität.

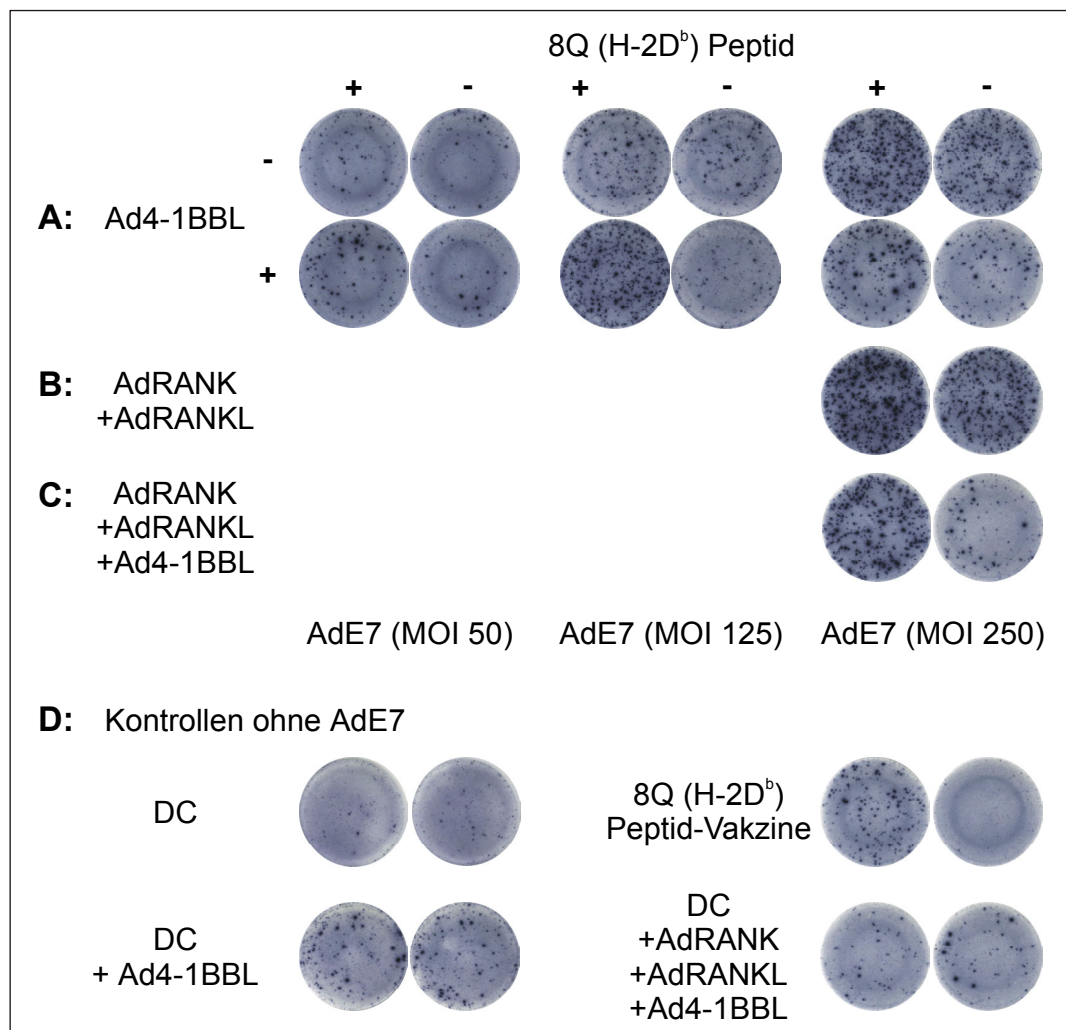


Abb. 3.37: Effekt von 4-1BBL auf die Spezifität der Immunantwort im *ex vivo* IFN γ -ELISPOT. Die dendritischen Zellen (DC) wurden nach dem Schema aus Abb. 3.27 A aus dem Knochenmark von A2.1K^b-transgenen Mäusen mit GM-CSF und IL-4 generiert. Die Zellen wurden am Tag 4 mit den angegebenen adenoviralen Vektoren und der jeweiligen MOI infiziert. Für die Infektion mit Ad4-1BBL, AdRANK bzw. AdRANKL wurde jeweils eine MOI von 100 verwendet. Als Kontrollgruppen dienten Mäuse, die mit Mock-infizierten dendritischen Zellen bzw. dem Peptid-Vakzin immunisiert wurden. Zehn Tage nach der Immunisierung wurden die Milzzellen isoliert und die E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort im *ex vivo* IFN γ -ELISPOT untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Immunisierung mit dendritischen Zellen zur gleichzeitigen Aktivierung einer unspezifischen Immunantwort führte (D). Durch den Transfer von 4-1BBL konnte die Spezifität der induzierten Immunantwort gegen E7 gesteigert werden (A, C) jedoch nicht durch die Koexpression von RANK und RANKL (B).

Die Daten zur Untersuchung des Einflusses von 4-1BBL, RANK und RANKL auf die Immunisierungseffizienz von dendritischen Zellen unter optimalen Bedingungen für das exprimierte Antigen haben gezeigt, daß diese drei kostimulatorischen Moleküle zusammen zur Initiation einer effizienteren T-Zellantwort durch die dendritischen Zellen führte. Dagegen führte die Koinfektion der dendritischen Zellen mit AdE7 und Ad4-1BBL bzw. AdE7, AdRANK und AdRANKL nicht zu einer Verbesserung der stimulatorischen Eigenschaft der dendritischen Zellen unter diesen Bedingungen. Diese weitere Verbesserung der stimulatorischen Eigenschaft der dendritischen Zellen durch RANK, RANKL und 4-1BBL könnte auf die gezeigte Zunahme der Expression von MHC II, CD80 und CD86 (Abb. 3.23) zurückzuführen sein, da der gleichzeitige Transfer von RANK, RANKL und 4-1BBL zu der stärksten Expressionszunahme führte. Neben der Expressionszunahme von MHC II, CD80 und CD86 könnten aber auch andere Mechanismen als Ursache für die Verbesserung der stimulatorischen Eigenschaft der dendritischen Zellen nicht ausgeschlossen werden. Da diese Mitglieder der TNF- und TNFR-Superfamilie zur Aktivierung von NF κ -B führen (siehe 1.4), könnte der Effekt von RANK, RANKL und 4-1BBL auch auf eine anti-apoptotische Wirkung sowie der Produktion von Zytokinen zurückgehen.

Die Auswertung der *ex vivo* IFN γ -ELISPOTs zur Untersuchung der Effektor-T-Zellantwort unterstützte die Annahme, daß die einzelnen TNF/TNFR-Paare möglicherweise unterschiedliche Effekte auf die dendritischen Zellen haben. So konnte in den Mäusen, die mit dendritischen Zellen immunisiert wurden, eine gleichzeitige Initiation einer E7-unspezifischen Immunantwort im Vergleich zu Peptid-immunisierten Mäusen beobachtet werden (Abb. 3.37 D). Die E7-unspezifische Immunantwort könnte auf FCS-spezifische Epitope zurückgehen, da die dendritischen Zellen in Medium mit Serum kultiviert wurden, wodurch sie im Serum enthaltene Proteine aufnehmen, prozessieren und präsentieren können. Die Stärke der durch die dendritischen Zellen induzierten unspezifischen Immunantwort nahm durch die Infektion der dendritischen Zellen mit den rekombinanten Adenoviren zu, unabhängig von der E7-Expression (Abb. 3.37 A, D). Wegen dieser gleichzeitigen Aktivierung einer E7-unspezifischen Immunantwort durch die dendritischen Zellen wurde vermutet, daß die *in vitro* Restimulation in diesen Gruppen ineffizienter erfolgte als in den Peptid immunisiert Gruppen, da die Halbwertszeit der Stimulatorzellen neben der E7-spezifischen Immunantwort auch von der gleichzeitig induzierten E7-unspezifischen Immunantwort abhing (siehe auch 3.4.2.2). Durch die Koinfektion der dendritischen Zellen mit Ad4-1BBL war die Anzahl der E7-unspezifisch IFN γ -sekretierenden Zellen (in Abwesenheit des Peptides) im Vergleich zu AdE7-infizierten dendritischen Zellen deutlich geringer (Abb. 3.37 A). Diese Reduktion konnte nicht nach dem Transfer von RANK und RANKL beobachtet werden. Die Immunisierung mit dendritischen Zellen, die mit AdE7, AdRANK und AdRANKL koinfiziert wurden, führte nur zu einer generellen Zunahme der IFN γ -sekretierenden Zellen in Anwesenheit und Abwesenheit des Peptides (Abb. 3.37 C). Die 4-1BBL-spezifische Reduktion der durch die dendritischen Zellen induzierten E7-unspezifisch IFN γ -sekretierenden Zellen konnte auch bei der Kombination von 4-1BBL mit RANK und RANKL gezeigt werden (Abb. 3.37 C). Auch bei der Koinfektion der AE7-infizierten dendritischen Zellen mit AdCD40, AdCD40L und Ad4-1BBL nahm die unspezifische Immunantwort im *ex vivo* IFN γ -ELISPOT ab, jedoch nicht ohne Ad4-1BBL. Die Ursache dieser Reduktion durch 4-1BBL ist unklar. Es zeigt aber, daß 4-1BBL für die

Immuntherapie sehr interessant sein könnte, und die TNF/TNFR-Paare vermutlich unterschiedliche Effekte auf die dendritischen Zellen ausüben, die zu einer Verbesserung der stimulatorischen Eigenschaft der Zellen führen.

Die Untersuchung des Einflusses des Transfer der kostimulatorischen Moleküle auf die HPV-16 E7-spezifische T-Zellantwort hat gezeigt, daß durch die Expression von 4-1BBL bzw. RANK und RANKL die immunstimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen verbessert werden konnte. So konnte die durch die dendritischen Zellen *in vivo* induzierte H-2D^b-restringierte Effektor- und *memory* T-Zellantwort gegen E7 durch den Transfer von 4-1BBL bzw. RANK und RANKL signifikant erhöht werden, jedoch nicht durch CD40 und CD40L. In Abhängigkeit von der Menge des exprimierten Antigens konnte durch die Koinfektion der dendritischen Zellen mit AdE7 und Ad4-1BBL, AdE7, AdRANK und AdRANKL bzw. AdE7, Ad4-1BBL, AdRANK und AdRANKL eine effizientere E7-spezifische T-Zellantwort induziert werden. Die Koexpression von 4-1BBL, RANK und RANKL zusammen führte auch unter nicht-limitierenden Antigenbedingungen zu einer signifikanten Steigerung der E7-spezifischen T-Zellantwort, aber nicht 4-1BBL oder RANK/RANKL allein. Die Verbesserung der Immunisierungseffizienz der dendritischen Zellen könnte auf der durch den Transfer von 4-1BBL bzw. RANK und RANKL gezeigten Erhöhung des Expressionsniveaus von MHC II, CD80 und CD86 beruhen (Abb. 3.22 und Abb. 3.23). Die Steigerung der immunstimulatorischen Kapazität der dendritischen Zellen könnte aber auch auf andere Mechanismen, wie z.B. der Sekretion von Zytokinen, zurückgehen, da sich der Differenzierungsgrad der Zellen allgemein verbessert (siehe MHC II Abb. 3.22 und Abb. 3.23). Durch die Expression der kostimulatorischen Moleküle nahm auch die Homogenität der dendritischen Zellkulturen zu und war vergleichbar zu dem Differenzierungsgrad der Kulturen, die ohne kostimulatorische Moleküle am Tag 10 nach Isolation im FACS untersucht wurden (Abb. 3.17). Der spezifische Effekt von 4-1BBL auf die durch die dendritischen Zellen gleichzeitig induzierte unspezifische Immunantwort (Abb. 3.37) deutete darauf hin, daß die verschiedenen TNF/TNFR-Paare möglicherweise unterschiedliche Mechanismen, die sich gegenseitig nicht inhibieren, neben der allgemeinen Aktivierung von NFκ-B zur Verbesserung der stimulatorischen Eigenschaft der dendritischen Zellen besitzen. Die Verbesserung der Immunisierungseffizienz von dendritischen Zellen durch den Transfer von kostimulatorischen Molekülen der TNF- bzw. TNFR-Superfamilie könnte daher für die Entwicklung einer effektiven Immuntherapie mit therapeutischem Nutzen von großem Interesse sein.

4 Diskussion

Die Immuntherapie als neuartige Behandlungsmethode von Tumor- und chronischen Infektionserkrankungen hat durch die Bestätigung der von Burnet und Thomas 1967 postulierten „Tumor-Immunüberwachung“- (*cancer immune surveillance*) Hypothese⁴⁵⁻⁴⁷ an Bedeutung gewonnen⁴⁸. Der Immuntherapie liegt zugrunde, daß Tumore bzw. mit einem Erreger-infizierte Zellen über spezifische Antigene verfügen, die eine Immunität bewirken können⁵¹. Die spezifische Erkennung und Eliminierung dieser Zellen beruht auf immunologischen Effektorzellen, wie z.B. zytotoxischen T-Zellen^{3,44}. Dendritische Zellen besitzen wegen ihrer einzigartigen Fähigkeit, naive T-Zellen aktivieren zu können, eine zentrale Kontrollfunktion bei der Initiation von Immunantworten und stehen deshalb im Mittelpunkt heutiger immuntherapeutischer Ansätze⁶⁹. Tumore und Viren besitzen jedoch spezielle Strategien, wie die Produktion von TGF- β oder IL-10^{63,64}, um der Kontrolle des Immunsystems zu entkommen, so daß sie gegen die Eliminierung durch T-Zellen geschützt sind⁶⁵ und eine immunologische Toleranz induzieren. Um diese Toleranz zu durchbrechen und eine effektive Aktivierung und Expansion der tumorspezifischen Effektorzellen zu induzieren, wird nach Wegen gesucht, die stimulatorische Eigenschaft von dendritischen Zellen zu verbessern⁶⁸.

Die Infektion mit HPV, insbesondere HPV-16, ist der größte Risikofaktor für die Entwicklung von Zervixkarzinomen¹⁸, weltweit die dritthäufigste Krebserkrankung bei Frauen¹⁹ mit 400.000 neuen Fällen pro Jahr²⁰. Die transformierende Wirkung der HPVs beruht unter anderem auf dem viralen Onkogen E7, das konstitutiv in allen transformierten Zellen exprimiert wird und für die Aufrechterhaltung des transformierten Zustandes der infizierten Zellen notwendig ist³²⁻³⁵. Aus diesem Grund stellt E7 ein ideales tumorspezifisches Antigen für die Immuntherapie HPV-assoziierten Antigene dar³¹⁰. Die Einbeziehung des HPV-16 Hauptkapsidproteins L1 bietet neben der Initiation einer T-Zell-vermittelten Immunantwort gegen ein weiteres Antigen von HPV-16^{285,286} auch einen prophylaktischen Nutzen, da eine protektive Antikörperantwort induziert werden kann³¹¹.

Die Möglichkeit der Initiation und Verbesserung einer Immunantwort gegen HPV-16 durch Immunisierung mit adenoviral transduzierten dendritischen Zellen wurde in einem A2.1K^b-transgenen Mausmodell untersucht. Zur Verbesserung der stimulatorischen Eigenschaft der dendritischen Zellen wurde der Einfluß des zusätzlichen Transfers von kostimulatorischen Molekülen der TNF- bzw. TNFR-Superfamilie auf die HPV-16-spezifische Immunantwort analysiert.

4.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind bei der Regulation des Immunsystems von besonderer Bedeutung, da sie neben der Initiation von zellulären und humoralen Immunantworten auch die Induktion der zentralen und peripheren immunologischen Toleranz kontrollieren⁶⁹. Wegen dieser einzigartigen Eigenschaft sind sie für die Verwendung als natürliches Adjuvans in immuntherapeutischen Ansätzen prädestiniert⁶⁹. Basierend auf ihrem Vorkommen, ihrer

Differenzierung und ihrer Funktion werden sie in unreife und ausgereifte dendritische Zellen unterteilt⁶⁹. Da reife dendritische Zellen ein höheres immunstimulatorisches Potential besitzen und daher effizienter T-Zellen aktivieren können⁶⁹, ist der Differenzierungszustand der dendritischen Zellen für immuntherapeutische Einsätze von Bedeutung. Der Unterschied in der Morphologie, Antigenaufnahme und stimulatorischen Eigenschaft zwischen unreifen und reifen dendritischen Zellen kann anhand der Expression von CD11c und der Expressionsintensität von MHC II, CD80 und CD86 gezeigt werden¹⁵⁸, wobei in reife dendritische Zellen größere Mengen an MHC II, CD80 und CD86 exprimiert werden¹⁵⁸.

4.1.1 Generierung dendritischer Zellen

Für die Generierung dendritischen Zellen stehen bei der Maus verschiedene Anreicherungs- und Kultivierungsverfahren zu Verfügung^{129,312,313}. Die *in vitro* Kultivierungsmethode aus Knochenmarksvorläuferzellen ist leicht durchführbar und verspricht die höchsten Ausbeuten an dendritischen Zellen mit einem relativ homogenen Differenzierungsgrad^{110,129,157,158}.

In Anlehnung an die Protokolle von Inaba et al.¹²⁹ und Lutz et al.¹⁵⁸ wurden Knochenmarkszellen nach Depletion der Erythrozyten mit GM-CSF und IL-4 für sechs Tage kultiviert. Bei diesem Standardprotokoll wurde auf eine zusätzliche Depletion kontaminierender Zelltypen, wie B-Zellen, T-Lymphozyten, MHC II⁺- oder FcR⁺-Zellen durch Antikörper und Komplement¹⁵⁷ verzichtet, da hierdurch auch dendritische Vorläuferzellen depletiert werden können¹⁵⁸. Auf die Zugabe von LPS oder TNF α zur Steigerung des Differenzierungsgrads gegen Ende der Kultivierungsdauer¹⁵⁸ wurde ebenso verzichtet, da auch ohne dieses Schritt die spätere Induktion einer effektiven Immunantwort gezeigt wurde^{159,314,315}.

Mit dem hier etablierten Standardprotokoll konnte die Differenzierung der Knochenmarkszellen bzw. der dendritischen Vorläuferzellen in dendritische Zellen induziert werden, durchschnittlich 45-55 % der Zellen waren CD11c⁺ und MHC II⁺ (siehe Abb. 3.17). Dies entspricht einer Ausbeute von $3,5\text{-}4,5 \times 10^6$ CD11c⁺/MHC II⁺ dendritischen Zellen pro Maus. Der Anteil der CD11c⁺/MHC II⁺ dendritischen Zellpopulation konnte durch die Verlängerung der Kultivierungsdauer von sechs auf zehn Tage bis auf 70 % erhöht werden, bei gleichzeitiger Reduktion der CD11c⁻/MHC II⁻-Zellen. Bei den CD11c⁻/MHC II⁻-Zellen handelt es sich wahrscheinlich um Granulozyten¹⁵⁸. Der Einfluß der Kultivierungsdauer auf die Ausbeute an dendritischen Zellen und die Reduktion der kontaminierenden Zelltypen deutet darauf hin, daß die CD11c⁻/MHC II⁻-Zellen am Tag 6 noch zu dendritische Zellen differenzieren können. Die breite Streuung der MHC II-Expression an den Tagen 6 und 10 könnte auf dendritischen Zellen unterschiedlichen Differenzierungsgrads beruhen¹⁵⁸, so daß unter den Standardbedingungen wahrscheinlich vermehrt unreife dendritische Zellen mit geringerer MHC II-Expression gewonnen werden.

Im Vergleich zum Protokoll von Inaba et al.¹²⁹ lieferte die hier verwendete Vorgehensweise unter den Standardbedingungen, mit sechs Tagen Kultivierung, vergleichbare Ausbeuten an reifen und unreifen dendritischen Zellen. Allerdings kann die Ausbeute an dendritischen Zellen durch die Verlängerung der Kultivierungsdauer auf acht bzw. zwölf

Tage erhöht und die Kontamination mit anderen Zelltypen reduziert werden^{158,169,177}. Eine andere Möglichkeit, die Reinheit der dendritischen Zellpopulation zu erhöhen, bietet die Depletion von kontaminierenden Zelltypen durch Antikörper und Komplement zu Beginn der Kultivierung^{129,273,314} bzw. die Anreicherung der dendritischen Zellen mittels eines Metrizamid-Dichtegradienten am Ende der Kultivierung^{315,316}. Durch diese zusätzlichen Schritte wird jedoch auch die Ausbeute an dendritischen Zellen reduziert¹⁵⁸. Um den Anteil an reifen dendritischen Zellen zu erhöhen, werden in einigen Protokollen gegen Ende der Kultivierung LPS oder andere Differenzierungsstimuli zugegeben^{129,158}. Da auch ohne diese Faktoren eine effektive Immunantwort mit Tumorimmunität induziert werden kann^{159,169,273,314,315,317}, ist die Notwendigkeit dieser zusätzlichen Differenzierungsstimuli im murinen System unklar. Besonders die Initiation einer effektiven Immunantwort nach Immunisierung mit dendritischen Zellen, die entweder nur 5 Tage kultiviert wurden³¹⁵ oder nur zu 30 bis 40 % aus dendritischen Zellen (CD11c⁺) bestanden²⁷³, führte zu der Entscheidung, daß etablierte Standardprotokoll nicht weiter zu optimieren, da schnell und effizient dendritische Zellen mit stimulatorischen Fähigkeiten in ausreichender Anzahl generiert werden können. Ein weitere Vorteil der möglicherweise nur suboptimalen *in vitro* Kultivierungsmethode könnte sein, daß der Effekt von kostimulatorischen Molekülen eventuell deutlicher zu demonstrieren ist und neue Erkenntnisse über mögliche Wege zur Optimierung der immunstimulatorischen Eigenschaft von dendritischen Zellen liefert.

4.1.2 Gentransfer in dendritische Zellen mit adenoviralen Vektoren

Da dendritische Zellen, die Tumorantigene präsentieren, äußerst potent zytotoxische T-Zellen aktivieren können¹⁶⁰, müssen die für immuntherapeutische Ansätze *in vitro* generierten dendritischen Zellen so verändert werden, daß sie tumorspezifische Antigene auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Dafür stehen zahlreiche *ex vivo* Methoden zur Verfügung. Neben dem Beladen (Pulsen) mit tumorspezifischen Peptiden¹⁶¹, Proteinen¹⁶³ oder Tumorlysaten¹⁶⁵ stellt die genetische Modifikation einen vielversprechenden Weg dar. Vorteile der genetischen Modifikation durch virale Vektoren³¹⁸, RNA¹⁷⁰ oder DNA¹⁶⁹ ist der Transfer des gesamten Antigens mit der Nutzung aller potentiell enthaltenen antigenen Determinanten, unabhängig von den exprimierten MHC I/II-Molekülen. Die endogen exprimierten Antigene können direkt für die Beladung von MHC-Moleküle prozessiert werden, weshalb die Antigene im Vergleich zum Pulsen über einen längeren Zeitraum effizient präsentiert werden¹⁷². Weiterhin bietet die genetische Modifikation auch die Möglichkeit mehrere Gene gleichzeitig transferieren zu können, wie z.B. Gene für kostimulatorische Faktoren zur Verbesserung der stimulatorischen Eigenschaft der dendritischen Zellen.

Wegen der geringen Transfereffizienz von physikalischen, nicht-viralen Systemen in dendritische Zellen¹⁷³, wurden virale Vektoren entwickelt. Obwohl der Einsatz von viralen Vektoren von der Identifikation tumorspezifischer und Tumor-assoziierten Antigene abhängt und nicht wie bei tumorspezifischer RNA oder cDNA¹⁷¹ das gesamte antigen Repertoire genutzt wird, reduziert es die Gefahr einer Autoimmunität durch die gleichzeitige Präsentation von Antigenen, die auch in gesundem Gewebe exprimiert werden^{168,319}. Als sehr gut erwiesen sich hierbei adenovirale Vektoren, die unabhängig vom Ursprung der dendritischen Zellen zwischen 80 und 100 % transduzieren, ohne die Differenzierung

der Zellen zu inhibieren^{174-177,320,321}. Nach der Infektion mit adenoviralen Vektoren konnte sowohl in humanen als auch in murinen dendritischen Zellen die Expression des Antigens und die Initiation einer Immunantwort gegen das exprimierte Antigen nachgewiesen werden^{174-177,321}. Durch die *ex vivo* Modifikation der dendritischen Zellen werden die Probleme der hohen Immunogenität²³⁵⁻²³⁷ adenoviraler Vektoren bei einer direkten Injektion minimiert, da keine toxische Wirkung bzw. eine gegen die transduzierten Zellen gerichtete Immunantwort nachgewiesen wurde^{243,244,321}.

Das verwendete Protokoll zur Infektion der dendritischen Zellen mit adenoviralen Vektoren basierte auf den Erfahrungen in der Arbeitsgruppe Lindenmaier/Dittmar, daß die Infektionsrate bei vier Tage alten Kulturen höher war als zu späteren Zeitpunkten. Bei der Verwendung einer MOI von 100 für AdeGfp konnte anhand der EGFP-Expression gezeigt werden, daß mindestens 50 % der dendritischen Zellen (CD11c⁺/MHC II⁺) infiziert werden können (siehe Abb. 3.17). Dieses Ergebnis wurde durch die Auswertung der immunozytochemischen Färbungen (siehe 3.3.2) bestätigt, da auch hier bei einer MOI von 100 Infektionsraten ≥ 50 % beobachtet wurden. Diese Infektionsraten stimmen mit denen in der Literatur überein^{177,304}. Da das Expressionsniveau von dendritischen Zellen im Vergleich zu anderen Zelltypen geringer ist¹⁵⁹, könnte die Infektionsrate eventuell auch höher gewesen sein, wenn in einigen Zellen die Transgen-Expression unterhalb der Nachweisgrenze der EGFP-Fluoreszenz bzw. der immunozytochemischen Färbungen lag. Zusätzlich könnte die effiziente Prozessierung des Transgens die Detektion der infizierten Zellen erschweren. Die EGFP-Expression wurde üblicherweise 48 h nach der Infektion nachgewiesen, konnte am Mikroskop jedoch auch schon nach 24 h detektiert werden. Von Ribas et al.³²² wurde gezeigt, daß murine dendritische Zellen auch fünf Tage nach der Infektion mit dem rekombinanten Adenovirus noch das Transgen exprimieren. In dieser Arbeit konnte die EGFP-Expression noch sechs Tage nach Infektion der Zellen mit AdeGfp nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.17). Somit sollte im Gegensatz zu gepulsten dendritischen Zellen die Präsentation der prozessierten Peptidfragmente, unabhängig vom natürlichen Metabolismus der MHC-Moleküle, über einen längeren Zeitraum erfolgen¹⁷².

Die HPV-16 L1-Expression konnte in infizierten murinen und humanen dendritischen Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.18 bzw. Abb. 3.20). Dagegen konnte die Expression von HPV-16 E7 bzw. des E7-Teils der L1/E7-Fusionsproteine in murinen dendritischen Zellen nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.19). In den humanen dendritischen Zellen konnte die Expression der E7 Sequenzen der L1/E7-Fusionsproteine detektiert werden, aber nicht von E7 nach Infektion mit AdE7 (siehe Abb. 3.21). Die Probleme mit dem E7-spezifischen Nachweis lassen sich vermutlich auf mehrere Ursachen zurückführen. Der Vergleich des E7-spezifischen Nachweis' mit den L1-Färbungen in A549 Zellen zeigt eine geringere Sensitivität der E7-Färbungen, die bei murinen dendritischen Zellen durch die primären Antikörper vermutlich noch geringer ist als mit humanen. Zusätzlich könnte die Detektion von E7 nach Infektion mit AdE7 durch die kurze Halbwertszeit des E7-Proteins³⁰² und durch die Verwendung einer gegenüber dem Wildtyp-Protein instabileren E7-Variante²⁹¹ erschwert werden. Die Initiation einer E7-spezifischen T-Zellantwort nach Immunisierung mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen demonstrierte, daß E7 exprimiert wird, jedoch die Sensitivität der Nachweisreaktion zu gering ist. Der Vergleich dieser Immunantwort mit der von AdL1p/E7-infizierten

dendritischen Zellen zeigt, daß die Fusion von E7 mit L1 zu einer Stabilisierung von E7 führen könnte. Diese Stabilisierung könnte auf einer geringeren Antigenprozessierung beruhen²⁹¹.

Die Infektion der dendritischen Zellen mit adenoviralen Vektoren hatte keinen signifikanten Effekt auf die Generierung, Ausbeute und Differenzierung der Zellen. Die Ursache für die leichte Reduktion der MHC II-Expression in infizierten Kulturen am Tag 10 ist unklar, da auch bei Infektionen mit höheren MOIs (bis 1000) keine zytotoxischen Effekte beobachtet wurden. Diese Reduktion ist in der Literatur nicht beschrieben. Für murine dendritische Zellen ist gezeigt, daß die adenovirale Infektion ein neutrales³⁰³ oder leicht aktivierendes Signal³⁰⁴ darstellt. Auch bei humanen dendritischen Zellen stellt die Infektion mit adenoviralen Vektoren ein schwach aktivierendes Signal dar, das nicht die spätere Differenzierung in reife Zellen blockiert¹⁷⁶. Bei den *in vivo* Experimenten konnte in den Gruppen, die durch Adegfp-infizierte dendritische Zellen immunisiert wurden, gegenüber der durch Mock-infizierte dendritische Zellen immunisierten Gruppe eine leichte, reproduzierbare Zunahme der unspezifischen Immunantwort im *ex vivo* IFN γ -ELISPOT beobachtet werden, was auf eine geringe Aktivierung der dendritischen Zellen durch die Infektion mit Adegfp zurückgehen könnte. Ein direkter negativer Effekt der Infektion mit adenoviralen Vektoren scheint daher eher unwahrscheinlich. Die Möglichkeit einer toxisch wirkenden Kontamination in den hergestellten Adenovirusstocks, welche die MHC II-Expression beeinflußt, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Ebenso kann auch ein technisches Problem bei den FACS-Messungen nicht vollkommen ausgeschlossen werden, da lediglich die MHC II- und nicht die CD11c-Expression betroffen war.

4.1.3 Einfluß der kostimulatorischen Moleküle auf die dendritischen Zellen

Bei der komplexen Interaktion von dendritischen Zellen mit T-Zellen ist eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen beteiligt. Diese Interaktion ist nicht nur für die Aktivierung von T-Zellen und Initiation einer T-Zell-vermittelten Immunantwort von zentraler Bedeutung, sondern induziert eine weitere Aktivierung der dendritischen Zellen, die auch als terminale Differenzierung bezeichnet wird. Dabei hat sich gezeigt, daß einige TNF/TNFR-Paare wegen ihrer restringierten Expression in T-Zellen bzw. dendritischen Zellen eine besondere Bedeutung zukommt¹⁴². Das bekannteste Beispiel ist das Rezeptor/Ligandenpaar CD40/CD40L¹⁸⁶. Die Aktivierung CD40⁺-dendritischer Zellen durch das in CD4⁺-T-Zellen exprimierte CD40L induziert die Differenzierung zu reifen dendritischen Zellen und Steigerung ihrer immunstimulatorischen Kapazität^{122,191,192}. Die Verbesserung der stimulatorischen Eigenschaft der dendritischen Zellen könnte auf die erhöhte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, der induzierten Produktion von Zytokinen wie IL-12, IL-1 und IL-6 sowie dem anti-apoptotischen Effekt durch die Induktion des Apoptose-Suppressors Bcl-x_L zurückgehen^{69,76,189,190,323}.

Durch die Bindung des in T-Zellen exprimierten RANKL an RANK auf dendritischen Zellen wird ebenfalls ein durch Bcl-x_L-vermittelter anti-apoptotischen Effekt auf die dendritischen Zellen induziert und die Produktion von Zytokinen (IL-12, IL-15, IL-1, IL-6) aktiviert^{124,197}. Die RANK/RANKL-Stimulation führt im Gegensatz zu CD40/CD40L nicht zur Erhöhung des Expressionsniveaus von CD80 und CD86 oder anderer Oberflächenmoleküle wie MHC II¹⁹⁷. Trotzdem wird durch RANK/RANKL die

stimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen zur Initiation einer T-Zellantwort verbessert^{196,197,204}.

Durch das TNF/TNFR-Paar 4-1BB/4-1BBL wird die Differenzierung von unreifen 4-1BB⁺-Zellen in reife dendritische Zellen induziert und die Expression von CD80 und CD86 erhöht^{214,215}. Zusätzlich aktiviert die 4-1BB/4-1BBL-Stimulation in dendritischen Zellen die Produktion der Zytokine IL-6 und IL-12^{214,215}. Diese Modifikationen der dendritischen Zellen durch 4-1BB/4-1BBL verbessern die stimulatorischen Eigenschaften der Zellen^{214,215}.

Um den in der Literatur beschriebenen Effekt von CD40/CD40L, RANK/RANKL sowie 4-1BBL als Aktivierungs- bzw. Differenzierungsstimuli für dendritische Zellen zu untersuchen, wurde im FACS neben der Expression von CD11c und MHC II auch die der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, die erst in reifen Zellen effizient exprimiert werden^{156,158} gemessen. Durch den Transfer der kostimulatorischen Moleküle der TNF- bzw. TNFR-Superfamilie konnte der Differenzierungszustand der dendritischen Zellen (CD11c⁺/MHC II⁺) sowie die Expression von CD80 und CD86 deutlich verbessert werden (siehe Tab. 3.5). RANK/RANKL bzw. die Kombination von RANK/RANKL mit 4-1BBL führten zur stärksten Modifikation der Expression von MHC II, CD80 und CD86 in den dendritischen Zellkulturen. Interessant bei diesen drei kostimulatorischen Molekülen war die deutliche Reduktion der CD11c⁻-Zellen. Die Abnahme der kontaminierenden CD11c⁻-Zellen führt zur Erhöhung der Reinheit bzw. Homogenität der dendritischen Zellkulturen und war auch in den Kulturen zu beobachten, die für zehn statt sechs Tage kultiviert wurden. Somit scheint durch den Transfer der kostimulatorischen Moleküle der TNF- bzw. TNFR-Superfamilie die Kultivierungsdauer zur Gewinnung einer homogenen und reiferen dendritischen Zellpopulation verkürzt zu werden. Diese Anreicherung differenzierter Zellen könnte auf den anti-apoptotischen Effekten der TNF/TNFR-Paare, insbesondere RANK/RANKL, beruhen³²⁴. Die Koexpression von CD40L/RANKL bzw. CD40/RANK zeigte, daß der positive Effekt auf die Differenzierung und Homogenität der dendritischen Zellkultur der kostimulatorischen TNF- und TNFR-Moleküle größtenteils auf dem Transfer der endogen in T-Zellen exprimierten Liganden (CD40L/RANKL) beruht. Allerdings kann durch die Erhöhung der endogen in dendritischen Zellen exprimierten Rezeptoren nach der Infektion mit AdCD40 und AdRANK die Aktivierung der dendritischen Zellen durch CD40L/RANKL weiter gesteigert werden, so daß der Transfer von Rezeptor und Ligand von Vorteil ist.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Wong et al.³²⁴ konnte durch die RANK/RANKL-Aktivierung eine Erhöhung des Expressionsniveaus von MHC II, CD80 und CD86 in den dendritischen Zellen beobachtet werden. Da dieser Effekt auf die dendritischen Zellen auch ohne den gleichzeitigen Transfer von RANK nachgewiesen wurde, scheint die genetische Modifikation zur Steigerung des stimulatorischen Potentials der dendritischen Zellen vielversprechender zu sein, als die Zugabe von RANKL als rekombinantes Protein³²⁴.

Überraschend war das Ergebnis, daß der Transfer von CD40/CD40L im Vergleich zu RANK/RANKL oder 4-1BBL den geringsten Effekt auf die Expression von MHC II, CD80 und CD86 in dendritischen Zellen hatte, obwohl die CD40/CD40L-Stimulation in vielen Protokollen zu Generierung dendritischer Zellen als Differenzierungsstimulus eingesetzt wird. Da die Expression von CD40 und CD40L in infizierten A549 Zellen

gezeigt wurde (Abb. 3.14) und die gefundenen Mutationen in den cDNAs für CD40 (3.2.1.1) und CD40L (3.2.1.2) beschrieben sind, kann nicht ausgeschlossen werden, daß RANK/RANKL und 4-1BBL potentere Stimuli sind als CD40/CD40L. In der Literatur ist ein ähnlicher Vergleich dieser kostimulatorischen Moleküle bislang nicht beschrieben. Um dieses Ergebnis zu bestätigen und die Funktionalität des von dem adenoviralen Vektor codierten CD40 bzw. CD40L eindeutig zu demonstrieren, könnte untersucht werden, ob das Signal der CD40/CD40L-Stimulation in dendritischen Zellen aus CD40^{-/-}-¹⁸⁷ bzw. CD40L^{-/-}-Mäusen¹⁸⁸ nach Infektion mit den entsprechenden Vektoren komplementiert werden kann.

Die Infektion der dendritischen Zellen mit Ad4-1BBL führt zur Bestätigung der Ergebnisse von Futagawa et al.²¹⁴ und Wilcox et al.²¹⁵, jedoch war die Steigerung der Expressionsintensität von MHC II, CD80 und CD86 schwächer als mit RANK/RANKL. Dies könnte darauf beruhen, daß die endogene Expression des Rezeptors (4-1BB) nicht wie im Falle von RANK erhöht wurde. Jedoch konnte nach der Infektion mit Ad4-1BBL eine Zunahme der für dendritische Zellkulturen typischen Zellaggregate sowie von Zellen mit der charakteristischen dendritischen Zellmorphologie beobachtet werden, was auf eine 4-1BB-Expression hindeutet und durch die Ergebnisse von Futagawa et al.²¹⁴ und Wilcox et al.²¹⁵, bestätigt wird. Die Versuche, die 4-1BB-Expression in den generierten dendritischen Zellen am Tag 6 im FACS nachzuweisen, blieben jedoch erfolglos. Da der gleiche 4-1BB-spezifische Antikörper wie von Futagawa et al.²¹⁴ verwendet wurde, scheint dieses Ergebnis eher auf technische Probleme zurückzugehen als auf die fehlende Expression von 4-1BB.

4.2 Vakzinierung mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen gegen Antigene von HPV-16

Die Arbeiten zur Untersuchung der immunstimulatorischen Fähigkeit der genetisch modifizierten dendritischen Zellen erfolgten *in vivo* in einem Mausmodell. Das ausgewählte A2.1K^b-transgene Modell zeichnet sich durch ein chimäres HLA-Molekül, bestehend aus der α -1 und α -2 Domäne der humanen HLA-A*0201 und der α -3 Domäne des murinen H-2K^b in einem H-2^b Hintergrund, aus²⁶³. Dieses Modell sollte die gleichzeitige Analyse der zellulären T-Zellantwort gegen die bekannten H-2D^b bzw. A2.1-restringierten CTL-Epitope in HPV-16 E7^{261,262} bzw. gegen das A2.1-restringierten CTL-Epitopes in HPV-16 L1²⁸⁶ erlauben.

Das Protokoll zur Vakzinierung der Mäuse mit dendritischen Zellen sowie die anschließende Untersuchung der T-Zellantwort erfolgt in Anlehnung an die Arbeiten von Doan et al.²⁷⁵ und Porgador & Gilboa³⁰⁵ und ist für die Analyse von T-Zellantworten optimiert (persönl. Mitteilung R. Tindle, SASVRC). Unter den Standardbedingungen (Abb. 3.27 A) erfolgte zehn Tage nach der Immunisierung der Mäuse mit den dendritischen Zellen bzw. dem Peptid-Vakzin, die aus dem jeweiligen Peptid in Adjuvants bestand, die Analyse der HPV-16-spezifischen T-Zellantwort. Dabei wurde durch den *ex vivo* IFN γ -ELISPOT die als direkte Effektor-T-Zellantwort bezeichnete T-Zellantwort ohne vorherige *in vitro* Restimulation analysiert. Für die Untersuchung der Initiation einer HPV-16-spezifischen *memory* T-Zellantwort durch die Immunisierung mit den

dendritischen Zellen im CTL-Assay und IFN γ -ELISPOT wurden die Milzzellen zuvor für sechs Tage *in vitro* restimuliert. Die T-Zellantwort nach der sechstägigen *in vitro* Restimulation wurde als *memory* T-Zellantwort bezeichnet, da die T-Zellen nach der Immunisierung zum zweiten Mal mit dem Antigen stimuliert wurden. Ob die hier als *memory* T-Zellantwort bezeichnete Immunantwort tatsächlich eine dauerhafte Immunität induziert oder die für *memory* T-Zellen spezifischen Oberflächenproteinen³²⁵ exprimiert, ist unklar.

Da die dendritischen Zellen in Medium mit FCS kultiviert wurden und durch die Aufnahme und Prozessierung von Rinderproteinen eine FCS-spezifische Immunantwort induzieren können, wurden die in der Milz enthaltenen professionellen APCs depletiert, um die Amplifikation einer FCS-spezifischen Immunantwort während der *in vitro* Restimulation zu reduzieren³⁰⁵. Die *in vitro* Restimulation für das H-2D^b-restringierte E7 CTL-Epitop 8Q erfolgte durch Zugabe einer konstitutiv E7-exprimierenden Zelllinie bzw. mit einer A2.1-exprimierenden Zelllinie, die zuvor mit dem jeweiligen A2.1-restringierten CTL-Epitop beladen wurde. Diese zelluläre *in vitro* Restimulationsmethode soll gegenüber der sonst weit verbreiteten Methode, die ohne APC-Depletion durch Zugabe des entsprechenden Peptides erfolgt, den weiteren Vorteil haben, daß bei Vakzinen, die eine Prozessierung der CTL-Epitope benötigen, in Mäusen mit H-2^b-Hintergrund die zelluläre *in vitro* Restimulation zu einer effizienteren Amplifikation der spezifischen Immunantwort führt (persönl. Mitteilung von A. Suhrbier, QIMR).

4.2.1 Etablierung des Mausmodells

In einigen Vorversuchen wurden A2.1K^b-transgene Mäuse mit den jeweiligen synthetisierten Peptiden der HPV-16 E7- bzw. L1-spezifischen CTL-Epitope oder dem HPV-16 E7-Protein immunisiert und die *memory* T-Zellantwort im CTL-Assay untersucht, um zu kontrollieren, ob das ausgewählte transgene Mausmodell die gleichzeitige Analyse einer durch das murine MHC I oder transgene A2.1K^b-restringierten T-Zellantwort erlaubt.

Von den identifizierten E7 CTL-Epitopen^{261,262} (siehe Abb. 3.24) konnte im CTL-Assay eine spezifische *memory* T-Zellantwort gegen das durch das murine H-2D^b-restringierte CTL-Epitop (8Q) sowie die beiden A2.1-restringierten Epitope 598 und 597, aber nicht gegen das A2.1-restringierte CTL-Epitop 599 nachgewiesen werden (Abb. 3.26 A, B). Gegen das A2.1-restringierte L1 CTL-Epitop²⁸⁶ konnte ebenfalls eine spezifische *memory* T-Zellantwort induziert werden. Allerdings konnte die Initiation einer spezifischen *memory* T-Zellantwort gegen die A2.1-restringierten CTL Epitope 597 und L1 nur nach *in vitro* Restimulation ohne APC-Depletion und Zugabe des jeweiligen Peptides detektiert werden, nicht aber nach zellulärer *in vitro* Restimulation. Da sich die im CTL-Assay verwendeten Targetzellen, die auch für die *in vitro* zelluläre Restimulation verwendet wurden, mit beiden Peptiden beladen ließen, ist die Ursache für diesen Unterschied zwischen den beiden Restimulationsmethoden unklar. Eine zeitlich limitierte Bindung der beiden Peptide an das transgene A2.1-Molekül, die z.B. auf einer geringen Bindungsaffinität beruht, kann aber nicht ausgeschlossen werden. Sollte dies der Fall sein, könnte der Unterschied zwischen den beiden Restimulationsmethoden auf die zu geringere Menge an verfügbarem Peptid nach der Dissoziation der auf den A2.1-Molekülen der Zellen gebundenen 597- bzw. L1-Peptide während der *in vitro* Restimulation zurückzuführen sein. Wegen

dieser technischen Probleme wurden nach Immunisierung mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen für die A2.1-restringierten CTL-Epitope 597 und L1 beide Restimulationsmethoden parallel durchgeführt.

Der Nachweis einer A2.1-restringierten 597-spezifischen *memory* T-Zellantwort im CTL-Assay durch die Immunisierung mit dem HPV-16 E7-Protein (Abb. 3.26 C) zeigt, daß in dem A2.1K^b-transgenen Mausmodell neben dem H-2D^b-restringierten auch das A2.1-restringierte E7 CTL-Epitop 597 durch das murine Proteasom prozessiert wird. Die A2.1-spezifischen T-Zellantworten waren jedoch generell deutlich schwächer als die H-2D^b-restringierte. Dieser Unterschied könnte auf eine ineffizientere Prozessierung der A2.1-restringierten CTL-Epitope durch das murine Proteasom zurückgehen. Andere Ursache könnten die geringe Frequenz an A2.1-spezifischen T-Zellen in diesem Modell und die wahrscheinlich ineffiziente Interaktion des murinen CD8-Moleküls auf den CD8⁺-CTLs mit dem chimären A2.1K^b-Molekül sein³⁰⁶. Aber auch eine unterschiedliche Bindungsaffinität von 8Q bzw. 597 für die Assoziation mit dem jeweiligen MHC I-Molekül kann nicht ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu 597 konnte nach Immunisierung mit dem E7-Protein die Initiation einer *memory* T-Zellantwort gegen das A2.1-restringierte CTL-Epitop 598 im CTL-Assay nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.26 C). Durch die Immunisierung mit dem 598-Peptid konnte dagegen eine 598-spezifische *memory* T-Zellantwort induziert werden, die aber immer schwächer war als die gegen 597 (Abb. 3.26 A, B). Auch Daten aus anderen Arbeiten, in denen eine Prozessierung von 598 aus E7 notwendig war, bestätigten dies³⁰⁷ (persönl. Mitteilung von R. Tindle, SASVRC). Daher erscheint die Nutzung dieses von Rensing et al.²⁶² identifizierten A2.1-restringierten CTL-Epitopes als ein natürliches E7 CTL-Epitop momentan fragwürdig.

Inwiefern die zelluläre *in vitro* Restimulation in einem Modell mit H-2^b-Hintergrund tatsächlich notwendig ist (siehe oben), bleibt unbeantwortet, da nach Immunisierung mit dem E7-Protein eine 597-spezifische *memory* T-Zellantwort trotz *in vitro* Restimulation durch Zugabe des Peptides nachgewiesen wurde (Abb. 3.26 C). Eine höhere Effizienz der zellulären Restimulation bei Vakzinen, die *in vivo* exprimiert werden, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

4.2.2 Induktion einer humoralen Immunantwort spezifisch für HPV-16 L1

Die Einbeziehung des HPV-16 Hauptkapsidproteins L1 als ein weiteres HPV-16-spezifisches Antigen neben E7 im Rahmen einer Immuntherapie hat eine Reihe von Vorteilen. Zum einen könnte durch die Initiation einer L1-spezifischen zellulären Immunantwort²⁸⁶ die Effizienz der Immuntherapie gesteigert werden. Die Immunisierung gegen mehrere HPV-16-spezifische Antigene reduziert die Möglichkeiten des Tumors bzw. Virus, sich durch Mutationen in einzelnen Antigenen dem immunologischen Angriff zu entziehen^{61,62}. Zum anderen kann mit L1 dem therapeutischen Ansatz auch ein prophylaktischer Nutzen durch die Induktion einer L1-spezifischen Antikörperantwort zugefügt werden, die vor der Infektion bzw. Re-Infektion mit HPV-16 schützt²⁵⁹. Die Induktion dieser protektiven Antikörperantwort beruht auf der Fähigkeit von L1 zur Bildung von leeren Viruskapsiden²⁸¹ (VLP, *virus-like particles*). In Mäusen führte die Immunisierung mit

HPV-16 L1-VLP zur Induktion einer L1-spezifischen Antikörperantwort²⁸², die gegen eine Infektion mit HPV-16 schützt^{283,284}. Durch die Fusion von L1 mit E7 können chimäre VLP (cVLP) generiert werden²⁸², die neben einer L1-spezifischen humoralen auch eine zelluläre Immunantwort gegen E7 induzieren und Mäuse gegen das Wachstum eines E7-transformierten Tumors schützen²⁸⁷. Daher könnte die genetische Modifikation dendritischer Zellen mit HPV-16 L1-Sequenzen für eine HPV-16-spezifische Immuntherapie neben der Eliminierung des transformierten Gewebes durch die zelluläre Immunantwort auch vor einer erneuten Infektion mit HPV-16 durch die Induktion L1-spezifischer Antikörper schützen.

Von Mercier et al.¹⁵⁹ wurde gezeigt, daß adenoviral transduzierte dendritische Zellen neben einer zelluläre auch eine humorale Immunantwort gegen das exprimierte Modellantigen (β -Galaktosidase) induzieren. Da die durch die dendritischen Zellen induzierte Antikörperantwort gegen β -Galaktosidase erst 20 bis 25 Tage nach der intramuskulären Immunisierung nachweisbar war¹⁵⁹, wurde das hier etablierte Vakzinierungsprotokoll (siehe Abb. 3.27 A), das für die Analyse von T-Zellantworten optimiert wurde (persönl. Mitteilung R. Tindle, SASVRC), modifiziert. So wurden die Mäuse 25 Tage nach der ersten Immunisierung erneut immunisiert und am Tag 35 nach der ersten Immunisierung die Antikörperantwort bzw. am Tag 36 die zelluläre Immunantwort analysiert (siehe Abb. 3.27 B). Die zweite Immunisierung erfolgte, um das für die Analyse der T-Zellantwort optimale Intervall von 9 bis 11 Tagen beizubehalten.

Mit den adenoviralen Vektoren, die HPV-16-Sequenzen codieren, standen unterschiedliche Möglichkeiten zur genetischen Modifikation der dendritischen Zellen bereit, um HPV-16 E7 mit L1 zu kombinieren. Einerseits kann durch die Infektion der dendritischen Zellen mit AdL1p/E7 ein Fusionsprotein aus L1 und dem gesamten E7-Protein exprimiert werden. Andererseits ist auch die Koinfektion mit AdE7 und AdL1p möglich, um E7 und L1 in dendritischen Zellen zu exprimieren. AdL1p ist dabei gegenüber AdL1p Δ C von Vorteil, da in AdL1p noch die interne Kernlokalisationssequenz am C-Terminus von L1 enthalten ist. Diese Sequenz scheint für die effiziente Bildung von VLP und der damit verbundenen Induktion einer Antikörperantwort von Bedeutung zu sein²⁹². Beide Möglichkeiten, die Infektion der dendritischen Zellen mit AdL1p/E7 bzw. AdL1p und AdE7, wurden durchgeführt und miteinander verglichen. Neben der Anpassung des Vakzinierungsprotokolls an die von Mercier et al.¹⁵⁹ beschriebene Kinetik der Antikörperinduktion wurde auch der Einfluß der Immunisierungsrouten (intramuskulär vs. subkutan) auf die Initiation einer L1-spezifischen Antikörperantwort durch AdL1p-infizierte dendritische Zellen untersucht.

In den A2.1K^b-transgenen Mäusen konnte weder nach Immunisierung mit AdL1p-infizierten noch mit AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen die Induktion einer HPV-16 L1-spezifischen Antikörperantwort nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.32). Auch die intramuskuläre Immunisierung mit AdL1p-infizierten dendritischen Zellen führte nicht zur Induktion einer L1-spezifischen Antikörperantwort, jedoch die Immunisierung mit HPV-16 L1-VLP (von M. Müller, DKFZ). Wegen der gezeigten Expression von L1 nach Infektion der dendritischen Zellen mit AdL1p bzw. AdL1p/E7 (Abb. 3.18) sowie der Initiation einer L1-spezifischen T-Zellantwort (Abb. 3.31 C) war dieses Ergebnis unerwartet. Da die Transgen-Expression in dendritischen Zellen sehr gering zu sein scheint¹⁵⁹, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die L1-Expression zu gering ist für die

zur Induktion einer Antikörperantwort benötigte effiziente Bildung und Sekretion von L1-VLP. Der Unterschied zu der Arbeit von Mercier et al.¹⁵⁹ könnte aber auch auf einer geringeren Immunogenität von HPV-16 L1 im Vergleich zu β -Galaktosidase beruhen. Daß die Fähigkeit von adenoviral transduzierten dendritischen Zellen zur Induktion einer signifikanten Antikörperantwort von der Immunogenität des Antigens abhängen könnte, wurde auch von anderen beobachtet³⁰⁸.

Um die Expression von HPV-16 L1 in dendritischen Zellen und damit die Bedingungen zur Induktion einer L1-spezifischen Antikörperantwort zu verbessern, könnten adenovirale Vektoren verwendet werden, die HPV-16 L1 mit humanisierten Codons codieren²⁹². Im Vergleich zu den hier verwendeten Konstrukten mit Pflanzenoptimierten Codons führt diese Modifikation der L1-Sequenz zu einer weiteren Steigerung der Expression von HPV-16²⁹².

4.2.3 Untersuchung der HPV-16-spezifischen Effektor-T-Zellantwort

Für die Initiation einer effektiven zellulären Immunantwort ist die Aktivierung der spezifischen T-Lymphozyten und ihre anschließende Differenzierung in Effektor-T-Zellen für die direkte Immunantwort sowie in Gedächtnis-T-Zellen (*memory* T-Zellen) für spätere Immunantworten von Bedeutung. Die als direkte Effektor-T-Zellantwort bezeichnete HPV-16-spezifische T-Zellantwort wurde unter den Standardbedingungen (Abb. 3.27 A) zehn Tage nach der Immunisierung der Mäuse bzw. 10 Tage nach der zweiten Immunisierung (Abb. 3.27 B) mit den dendritischen Zellen bzw. dem Peptid-Vakzin durch den *ex vivo* IFN γ -ELISPOT, ohne vorherige *in vitro* Restimulation, analysiert.

Abhängigkeit der Effektor-T-Zellantwort von der MOI und einer zweiten Immunisierung:

Die Untersuchung der direkten Effektor-T-Zellantwort zeigt, daß AdE7-infizierte dendritische Zellen eine signifikante T-Zellantwort gegen HPV-16 E7 in den Mäusen induzierten, die spezifisch für das H-2D^b-restringierte CTL-Epitop²⁶¹ und proportional zu der verwendeten MOI von AdE7 für die Infektion der dendritischen Zellen war (siehe Abb. 3.18). Die Immunisierung mit dendritischen Zellen, die mit einer MOI von 250 für AdE7 infiziert wurden, führte zu der höchsten Effektor-T-Zellantwort, die sogar signifikant höher war als mit dem Peptid-Vakzin. Die Anzahl der durch die dendritischen Zellen induzierten IFN γ -sekretierenden T-Zellen spezifisch für das H-2D^b-restringierte E7 CTL-Epitop war bei einer MOI von 250 für AdE7 vergleichbar zu denen von Mercier et al.¹⁵⁹ mit β -Galaktosidase-exprimierenden dendritischen Zellen. Die E7-spezifische Effektor-T-Zellantwort konnte durch die Erhöhung der MOI von AdE7 auf 500 nicht weiter erhöht werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf die möglicherweise toxische Wirkung von großen Mengen an Adenoviruspikeln beruhen³⁰⁴.

Eine zweite Immunisierung mit AdE7- (MOI 250) infizierten dendritischen Zellen führte zu einer Erhöhung der H-2D^b-restringierten E7-spezifischen Effektor-T-Zellantwort (Abb. 1.29) gegenüber einer Vakzinierung um den Faktor 6. In der Peptid-immunisierten Gruppe stieg die Anzahl der IFN γ -sekretierenden Zellen um den Faktor 3 und die Anzahl der E7-spezifischen IFN γ -sekretierenden T-Zellen war etwa sechsmal geringer als mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen. Diese Erhöhung der Immunantwort durch eine zweite Immunisierung mit dendritischen Zellen wurde auch von Kaplan et al.³²⁰ gezeigt.

Der Vergleich der Immunisierungseffizienz von dendritischen Zellen gegenüber dem Peptid-Vakzin demonstriert das besondere immunstimulatorische Potential dieser Zellen⁷⁹⁻⁸¹ und rechtfertigt ihren Einsatz in immuntherapeutischen Ansätzen.

Abhängigkeit der Effektor-T-Zellantwort von der Stabilität des exprimierten Antigens:

Im Gegensatz zu AdE7-infizierten dendritischen Zellen könnte nach der Vakzinierung mit AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen die Initiation einer H-2D^b-restringierten E7-spezifischen Effektor-T-Zellantwort nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.18). Auch eine zweite Immunisierung mit AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen führte nicht zu einer nachweisbaren Effektor-T-Zellantwort gegen E7 (Abb. 3.19). Dieses Ergebnis war unerwartet, da für die Infektion der dendritischen Zellen mit AdL1p/E7 die für AdE7 optimale MOI von 250 bzw. 300 verwendet wurde und sowohl AdE7 als auch AdL1p/E7 die von Shi et al.²⁹¹ beschriebene HPV-16 E7-Variante E7mut enthalten. Diese E7-Variante besitzt eine geringere Transformationsfähigkeit, die aus sicherheitstechnischen Gründen bei human-infektiösen Vektoren und einem potentiellen Onkogen vorteilhaft ist, sowie eine höhere Immunogenität als das ursprüngliche E7-Protein²⁹¹. Da die gesteigerte Immunogenität von E7mut auf die höhere Instabilität und damit verbundene effizientere Degradation bzw. Prozessierung zurückgeführt wird²⁹¹, könnte die Fusion von E7mut mit L1 zur Expression eines stabileren Proteins mit reduzierter Immunogenität der E7 CTL-Epitope führen. Die Ergebnisse der immunozytochemischen Färbungen für den Nachweis der E7-Expression in humanen dendritischen Zellen deutet auf eine Stabilitätszunahme von E7mut durch die Fusion hin (siehe 3.3.2.2 und Abb. 3.21). Daher scheint das unterschiedliche stimulatorische Potential von AdE7-infizierten und AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen vermutlich auf die Stabilisierung von E7mut durch die Fusion mit L1 zurückzugehen, die zu einer geringeren Prozessierung und damit geringeren Immunogenität der E7-CTL-Epitope führt.

A2.1-restringierte Effektor-T-Zellantwort gegen HPV-16 E7:

Nach der Immunisierung mit den AdE7-infizierten dendritischen Zellen konnte nur die Initiation einer schwachen, nicht signifikanten A2.1-restringierten Effektor-T-Zellantwort gegen das E7 CTL-Epitop 597²⁶² nachgewiesen werden (Abb. 3.28). Dies könnte auf der geringen Frequenz an A2.1-spezifischen T-Zellen in dem Modell sowie der wahrscheinlich ineffizienten Interaktion des murinen CD8-Moleküls auf den CD8⁺ CTLs mit dem chimären A2.1K^b-Molekül beruhen³⁰⁶. Dafür spricht neben der höheren Variabilität des 597-spezifischen *ex vivo* IFN γ -ELISPOTs auch die Tatsache, daß nach der Immunisierung mit dem Peptid-Vakzin keine 597-spezifische Effektor-T-Zellantwort nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.28), jedoch eine 597-spezifische *memory* T-Zellantwort (Abb. 3.30 C). Somit scheint die Expansion der 597-spezifischen T-Zellen während der *in vitro* Restimulation essentiell zu sein, um eine eindeutige Immunantwort nachweisen zu können. Aber auch eine geringere Prozessierung A2.1-restringierter CTL-Epitope durch das murine Proteasom könnte erklären, warum AdE7-infizierte dendritische Zellen eine sehr starke H-2D^b-restringierte Effektor-T-Zellantwort gegen E7 induzieren, aber nicht gegen 597. Zusätzlich kann aber auch die Mutation in E7mut²⁹¹, die das CTL-Epitop 597 modifiziert (Abb. 3.21), für die schwache 597-spezifische Effektor-T-Zellantwort durch die Immunisierung mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen verantwortlich sein. Für eine Vielzahl von anderen A2.1-restringierten CTL-Epitopen wurde gezeigt, daß eine solche

Modifikation neben der Bindung an das MHC I-Molekül auch die spezifische Erkennung durch den TCR negativ beeinflusst³²⁶. Trotz der allgemeinen Limitierungen des A2.1-transgenen Modells³⁰⁶ erscheint die 597-Mutation von Bedeutung zu sein, da im Gegensatz zum Peptid-Vakzin keine 597-spezifische *memory* T-Zellantwort mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen nachgewiesen werden konnte.

HPV-16 L1-spezifische Effektor-T-Zellantwort restringiert durch A2.1:

Wie für E7 konnte auch durch die zweimalige Immunisierung mit AdL1p- oder AdL1p/E7-infizierte dendritischen Zellen die Initiation einer sehr schwachen, nicht signifikanten A2.1-restringierten Effektor-T-Zellantwort gegen das L1 CTL-Epitop²⁸⁶ nachgewiesen werden (Abb. 3.29). Die intramuskuläre statt subkutane Immunisierung mit AdL1p-infizierten dendritischen Zellen zeigt keinen Effekt. Vermutlich ist dieses Ergebnis auf die Limitierungen des Mausmodell, wie die geringe Frequenz an A2.1-spezifischen T-Zellen und beeinträchtigte Interaktion des murinen CD8-Moleküls auf den CTLs mit dem chimären A2.1K^b-Molekül³⁰⁶ und eventuell auch auf eine ineffizientere Prozessierung des A2.1-restringierten CTL-Epitopes aus L1 bzw. L1/E7 durch das murine Proteasom zurückzuführen. Daß die Limitierungen des Mausmodells den Nachweis einer direkten Effektor-T-Zellantwort erschweren, zeigt auch die nicht nachweisbare Effektor-T-Zellantwort mit dem Peptid-Vakzin, für die allerdings eine L1-spezifische *memory* T-Zellantwort gezeigt werden konnte (Abb. 3.31 C).

4.2.4 Initiation einer HPV-16-spezifischen *memory* T-Zellantwort

Zusätzlich zu der direkten Effektor-T-Zellantwort, die am Tag 10 nach der Immunisierung ohne vorherige *in vitro* Restimulation durch den *ex vivo* IFN γ -ELISPOT bestimmt wurde, erfolgte die Untersuchung einer HPV-16-spezifischen *memory* T-Zellantwort. Hierfür wurden die isolierten Milzzellen für sechs Tage *in vitro* restimuliert und anschließend die HPV-spezifische *memory* T-Zellantwort durch den IFN γ -ELISPOT sowie CTL-Assay nachgewiesen. Die spezifische Restimulation für das H-2D^b-restringierte E7 CTL-Epitop erfolgte durch Zugabe der E7-exprimierenden Zelllinie EL4.E7. Für die A2.1-restringierten E7 CTL-Epitope 598 und 597 bzw. für das A2.1-restringierte L1 CTL-Epitop wurden konstitutiv A2.1-exprimierende EL4.A2.1 verwendet, die zuvor mit dem jeweiligen Peptid beladen wurden. Für die beiden CTL-Epitope 597 und L1 wurde parallel auch die alternative Restimulationsmethode ohne APC-Depletion durch Zugabe des entsprechenden Peptides durchgeführt, da die zelluläre *in vitro* Restimulation für diese CTL-Epitope nicht zu einer erfolgreichen Amplifikation der spezifischen T-Zellantwort führte (Abb. 3.26 A, B). Die im CTL-Assay und IFN γ -ELISPOT nachgewiesene T-Zellantwort wurde als *memory* T-Zellantwort bezeichnet, da die T-Zellen nach der Aktivierung *in vivo* durch die Immunisierung zum zweiten Mal mit dem Antigen stimuliert wurden. Ob diese Immunantwort tatsächlich zu einer dauerhaften Immunität führt bzw. die T-Zellen für *memory* T-Zellen spezifische Oberflächenproteine³²⁵ exprimieren, ist unklar.

In vitro Restimulation:

Der Vergleich der Anzahl an IFN γ -sekretierenden Zellen spezifisch für das H-2D^b-restringierte E7 CTL-Epitop²⁶¹ im IFN γ -ELISPOT mit restimulierten Zellen (Abb. 3.30 A) zum *ex vivo* IFN γ -ELISPOT (Abb. 3. 28) zeigt, daß die spezifischen T-Zellen während der

in vitro Restimulation erfolgreich aktiviert und expandiert wurden. Jedoch fiel auf, daß trotz der vergleichbaren bzw. stärkeren Effektor-T-Zellantwort mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen, in 7 von 8 Experimenten die *memory* T-Zellantwort schwächer war als mit dem Peptid-Vakzin. Somit scheint die *in vitro* Restimulation für AdE7-infizierte dendritische Zellen ineffizienter zu sein als für das Peptid-Vakzin. Bei der Auswertung der *ex vivo* IFN γ -ELISPOTs konnte neben der HPV-16-spezifischen T-Zellantwort auch die gleichzeitige Initiation einer unspezifischen Immunantwort durch die Immunisierung mit dendritischen Zellen beobachtet werden (Abb. 3.37). So wurden nach der Immunisierung mit dem Peptid-Vakzin nur sehr wenige IFN γ -sekretierende T-Zellen in Abwesenheit des untersuchten Peptides nachgewiesen (Abb. 3.37 D), die jedoch bei der Immunisierung mit dendritischen Zellen zunahm. Da die dendritischen Zellen in Medium mit Serum kultiviert wurden, könnte es sich bei dieser unspezifischen Immunantwort z. B. um FCS-spezifische T-Zellen³⁰⁵ oder natürliche Killerzellen³²⁷ handeln. Durch die Infektion der dendritischen Zellen mit adenoviralen Vektoren, unabhängig vom exprimierten Transgen, stieg die Anzahl der unspezifisch IFN γ -sekretierenden T-Zellen weiter an (Abb. 3.37 A, D). Diese weitere Zunahme der unspezifischen Immunantwort könnte auf eine schwache Aktivierung der dendritischen Zellen durch die Infektion mit den adenoviralen Vektoren³⁰⁴ hindeuten.

Die ineffizientere *in vitro* Restimulation für die mit dendritischen Zellen immunisierten Gruppen könnte auf die im Gegensatz zum Peptid-Vakzin gleichzeitige Initiation einer HPV-16-unspezifischen Immunantwort zurückgehen. So könnte die durch die dendritischen Zellen induzierte unspezifische Immunantwort zu einer schnelleren Lyse der zugegebenen Stimulatorzellen führen, da neben der HPV-16-spezifischen Lyse auch die unspezifische Immunantwort zu ihrer Lyse beitragen könnte, so daß die effiziente Expansion der HPV-16-spezifischen T-Zellen limitiert würde. Aus diesem Grund waren die *in vitro* Restimulationsbedingungen für die mit dendritischen Zellen immunisierten Gruppen vermutlich nicht optimal, um das immunstimulatorische Potential der dendritischen Zellen ermitteln zu können. Anders kann die in Abb. 3.31 dargestellte H-2D^b-restringierte *memory* T-Zellantwort gegen E7 nicht erklärt werden, da die Effektor-T-Zellantwort in den mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen sechsmal höher war als mit dem Peptid-Vakzin (Abb. 3.29). Die E7-spezifische *memory* T-Zellantwort war nach der *in vitro* Restimulation jedoch im IFN γ -ELISPOT dreimal bzw. die spezifische Lyse im CTL-Assay etwa 15% geringer als mit dem Peptid-Vakzin. Die hier etablierte *in vitro* Restimulation muß daher optimiert werden, um das tatsächliche stimulatorische Potential der dendritischen Zellen, ohne Interferenz mit der unspezifischen Immunantwort, ermitteln zu können. Dies könnte, wie in anderen Arbeiten mit dendritischen Zellen gezeigt, durch Zugabe von IL-2 und/oder durch die Reduzierung der Restimulationsdauer von sechs auf fünf Tage erfolgen^{317,321,328-331}.

Bei den insgesamt 14 durchgeführten CTL-Assays zeigte sich ein weiteres Problem. Durch die Verwendung einer Zelllinie, wie EL4.E7, als Stimulatorzellen während der *in vitro* Restimulation und anschließend als Targetzellen im CTL-Assay kann es zu einer gesteigerten Sensitivität der Targetzellen gegenüber der durch die zytotoxischen T-Zellen induzierten Lyse kommen. Dieses Phänomen ist auch in anderen Arbeitsgruppen bekannt und ist nicht spezifisch für E7 (persönl. Mitteilung von A. Suhrbier, QIMR). Vermutlich kommt es während der *in vitro* Restimulation zur unerwünschten Amplifikation einer

Immunantwort spezifisch für gleichzeitig auf den Stimulatorzellen präsentierte CTL-Epitope. Diese *in vitro* induzierte Immunantwort kann auch in den Kontrollgruppen, die durch Mock-infizierte bzw. AdeGFP-infizierte dendritische Zellen immunisiert wurden, zu artifiziell hohen Werten bei dem Effektor zu Target Verhältnis von 40:1 im anschließendem CTL-Assay führen. Da dieses Phänomen nicht bei dem Effektor zu Target Verhältnis von 10:1 beobachtet wird, bestätigt es, daß die Werte für das 40:1 Effektor zu Target Verhältnis artifiziell sind und auf eine *in vitro* generierte Immunantwort zurückgehen. Auch die geringeren Werte mit den Peptid-beladenen EL4.A2.1 als Targetzellen im Vergleich zu den EL4.E7 demonstriert dies.

Abhängigkeit der *memory* T-Zellantwort von der MOI und einer zweiten Immunisierung:

Wie zuvor für die Effektor-T-Zellantwort zeigte sich auch für die H-2D^b-restringierte E7-spezifische *memory* T-Zellantwort die Initiation einer signifikanten T-Zellantwort durch die Immunisierung mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen (Abb. 3.30 A, B). Die Stärke der E7-spezifischen *memory* T-Zellantwort war dabei proportional zur verwendeten MOI von AdE7 zur Infektion der dendritischen Zellen. Nach der Immunisierung mit dendritischen Zellen, die mit einer MOI von 250 für AdE7 infiziert wurden, war die Intensität der H-2D^b-restringierten T-Zellantwort im CTL Assay vergleichbar zu der von E7-Protein-gepulsten dendritischen Zellen²⁷³. Ebenso entsprach das stimulatorische Potential der AdE7-infizierten dendritischen Zellen dem von Adenovirus-modifizierten dendritischen Zellen aus anderen Arbeiten mit unterschiedlichen Antigenen und murinen Modellen^{244,320,321,330}.

Die zweite Immunisierung mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen führte nicht zu einer weiteren Erhöhung der E7-spezifischen *memory* T-Zellantwort (vergleiche Abb. 3.31 A, B mit Abb. 3.30 A, B). Da eine deutliche Verbesserung der E7-spezifischen Effektor-T-Zellantwort durch die zweite Immunisierung nachgewiesen wurde, könnten dieses Ergebnis auf die zuvor diskutierten Probleme mit der Effizienz der *in vitro* Restimulation beruhen.

Abhängigkeit der *memory* T-Zellantwort von der Stabilität des exprimierten Antigens:

Die Immunisierung mit AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen induzierte im Gegensatz zu AdE7-infizierte Zellen keine H-2D^b-restringierte E7-spezifische *memory* T-Zellantwort, trotz der für AdE7 optimalen MOI von 250 (Abb. 3.30 A, B). Auch nach einer zweiten Immunisierung mit AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen (MOI 300) konnte keine E7-spezifische *memory* T-Zellantwort nachgewiesen werden (Abb. 3.31 A, B). Dies könnte auf die bereits diskutierte (4.2.3) Stabilisierung von E7mut²⁹¹ durch die Fusion mit L1 zurückgehen. Wegen der reduzierten E7-spezifischen T-Zellantwort mit AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen scheint die Verwendung von AdL1p/E7 für die Entwicklung einer effektiven Immuntherapie gegen HPV-16 ungünstiger als die getrennte Infektion mit AdE7 und AdL1p.

A2.1-restringierte *memory* T-Zellantwort gegen HPV-16 E7:

Nach keiner der beiden *in vitro* Restimulationsmethoden konnte eine signifikante 597-spezifische *memory* T-Zellantwort nach der Immunisierung mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.30 C). Dagegen konnte nach der

in vitro Restimulation durch Zugabe des Peptides eine 597-spezifische *memory* T-Zellantwort in den Mäusen gezeigt werden, die mit dem 597-Peptid immunisiert wurden. Dies war unerwartet, da mit dem Peptid-Vakzin die Initiation einer Effektor-T-Zellantwort nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.28). Somit bestätigt dieses Ergebnis die bereits erläuterten (4.2.3) Limitierungen des A2.1K^b-transgenen Mausmodells³⁰⁶ und der möglicherweise geringeren Prozessierung A2.1-restringierter CTL Epitope durch das murine Proteasom, die eine *in vitro* Restimulation für den eindeutigen Nachweis einer A2.1-restringierten T-Zellantwort essentiell machen. Da aber mit AdL1p-infizierten dendritischen Zellen die Initiation einer A2.1-restringierten *memory* T-Zellantwort gegen L1 gezeigt werden konnte (Abb. 3.31 C), scheint dieses Ergebnis eher auf die Inaktivierung des CTL-Epitopes 597 (Abb. 3.21) durch die Mutation in E7mut²⁹¹ zurückzugehen. Durch die Veränderung der Sequenz von CTL-Epitopen kann sowohl die Bindungsaffinität an MHC I-Moleküle als auch die spezifische Erkennung des MHC I/Peptid-Komplexes reduziert werden³²⁶. Es wurde nicht kontrolliert, ob eine Immunantwort gegen das mutierte 597 durch die Immunisierung mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen induziert wurde, da es wahrscheinlich nicht weiter als HPV-16-spezifisches CTL-Epitop genutzt werden kann. Die Möglichkeit einer ineffizienten *in vitro* Restimulation durch die gleichzeitige Aktivierung einer unspezifischen Immunantwort durch die dendritischen Zellen (siehe oben) kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden.

Die Initiation einer A2.1-restringierten *memory* T-Zellantwort gegen das CTL-Epitop 598 nach der Immunisierung mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf die zuvor diskutierten Limitierungen des A2.1K^b-transgenen Mausmodells³⁰⁶, der möglicherweise geringeren Prozessierung A2.1-restringierter CTL Epitope sowie der nicht optimalen *in vitro* Restimulationsbedingungen zurückzuführen sein. Zusätzlich ist aber auch die Nutzung von 598 als ein natürliches, HPV-16 E7 prozessiertes, CTL-Epitop fraglich³⁰⁷ (persönl. Mitteilung von R. Tindle, SASVRC).

HPV-16 L1-spezifische *memory* T-Zellantwort restringiert durch A2.1:

Durch die zweimalige Immunisierung mit AdL1p- bzw. AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen konnte im IFN γ -ELISPOT eine signifikante *memory* T-Zellantwort gegen das von Kaufmann et al.²⁸⁶ identifizierte A2.1-restringierte CTL-Epitop nachgewiesen werden (Abb. 3.31 C). Hierbei scheint die Immunisierungsrouten keinen Einfluß zu besitzen. Die L1-spezifische *memory* T-Zellantwort mit dem Peptid-Vakzin zeigt, daß der Nachweis der T-Zellantwort neben den Limitierungen des A2.1K^b-transgenen Mausmodells³⁰⁶ auch durch eine ineffizientere *in vitro* Restimulation für die mit dendritischen Zellen immunisierten Gruppen (siehe oben) erschwert wird. Aber auch eine geringe Prozessierung des A2.1-restringierten L1 CTL Epitopes durch das murine Proteasom kann nicht ausgeschlossen werden. Durch die kürzliche Identifizierung eines H-2D^b-restringierten L1 CTL-Epitops³³² könnte, wie für E7, das immunstimulatorische Potential von AdL1p- bzw. AdL1p/E7-infizierten dendritischen Zellen unabhängig von den Limitierungen des A2.1K^b-transgenen Mausmodells untersucht werden.

4.3 Einfluß der kostimulatorischen Moleküle auf die immunstimulatorische Eigenschaft von dendritischen Zellen

Die Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Lymphozyten ist für die Initiation einer zellulären Immunantwort ein wichtiger Schritt und beruht auf einer Vielzahl von Membran-assoziierten Molekülen. Einige TNF/TNFR-Paare wie CD40/CD40L, RANK/RANKL und 4-1BB/4-1BBL sind wegen ihres Effekts auf dendritische Zellen und T-Zellen für die Immuntherapie interessant geworden^{68,142,182,216}. Ihre entscheidende Rolle in der Aktivierungskaskade von T-Zellen und dendritischen Zellen könnte den therapeutischen Nutzen einer Immuntherapie verbessern und in Situationen, in denen das Immunsystem durch spezielle Strategien des Tumors bzw. Virus tolerant oder anerg gegen die spezifischen Antigene geworden ist, die Initiation einer effektiven Immunantwort ermöglichen⁶⁸.

Nachdem gezeigt wurde, daß der Transfer der kostimulatorischen Moleküle der TNF- bzw. TNFR-Superfamilie die Differenzierung und Homogenität der dendritischen Zellkulturen verbessert (siehe 3.3.3), wurde untersucht, ob die Erhöhung der Expression von CD80 und CD86 auch einen nachweisbaren Effekt auf die stimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen auf die Initiation einer HPV-16-spezifischen Immunantwort *in vivo* hat. Da nach Immunisierung mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen die Initiation einer eindeutigen H-2D^b-restringierten E7-spezifischen T-Zellantwort gezeigt werden konnte, wurde der Einfluß der kostimulatorischen Moleküle auf die stimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen für die Initiation dieser Immunantwort näher betrachtet.

4.3.1 Einfluß von 4-1BBL auf die E7-spezifische T-Zellantwort

Bislang war das TNF/TNFR-Paar 4-1BB/4-1BBL lediglich durch seine kostimulatorische und anti-apoptotische Wirkung auf T-Zellen bekannt²¹⁶. Die 4-1BB-Expression konnte in CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten nach Aktivierung durch den T-Zellrezeptor induziert werden²⁰⁶. Die Expression des Liganden 4-1BBL wurde in dendritischen Zellen nachgewiesen und ist ebenfalls vom Aktivierungs- bzw. Differenzierungszustand der Zellen abhängig²⁰⁷. In T-Lymphozyten konnte nach 4-1BB/4-1BBL-Stimulation ein anti-apoptotischer Effekt nachgewiesen werden, der im direkten Zusammenhang mit der Induktion der Bcl-x_L- sowie IL-2-Expression steht²⁰⁸. Die kostimulatorischen Signale durch 4-1BB/4-1BBL verstärken primäre und sekundäre CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellantworten, die Entwicklung und die Überlebensrate von zytotoxischen Effektor- und *memory* T-Zellen sowie die Tumorimmunität²⁰⁹⁻²¹², ohne die zytotoxische Kapazität der einzelnen Zelle zu modifizieren²¹³. Das kostimulatorische 4-1BB/4-1BBL-Signal ist besonders für die Aktivierung von T-Zellen unter Antigen-limitierenden Bedingungen von Bedeutung²¹¹. Aus diesem Grund und aufgrund der Verbesserung der Effizienz von tumorspezifischen Peptid-Vakzinen durch die Kombination mit dem kostimulatorischen 4-1BB/4-1BBL-Signal, wodurch sogar die immunologische Toleranz gegenüber den Tumoren durchbrochen werden konnte²¹², wurde dieses TNF/TNFR-Paar für die Entwicklung effektiverer Vakzine attraktiv.

Durch die Entdeckung, daß 4-1BB auch in unreifen dendritischen Zellen exprimiert wird und die Bindung von 4-1BBL ein Differenzierungssignal für die dendritischen Zellen darstellt^{214,215}, hat 4-1BB/4-1BBL als kostimulatorisches Signal an Bedeutung gewonnen²¹⁶. In unreifen dendritischen Zellen konnte durch die Aktivierung von 4-1BB die Produktion der Zytokine IL-6 und IL-12 und die Zunahme der CD80- und CD86-Expression induziert werden^{214,215}. Während der Differenzierung der unreifen dendritischen Zellen in reife dendritische Zellen wird die 4-1BB-Expression verringert und die Expression von 4-1BBL induziert²¹⁴. Dieses einzigartige Expressionsprofil unterscheidet dieses TNF/TNFR-Paar von anderen wie CD40/CD40L oder RANK/RANKL und ermöglicht die Differenzierung der unreifen dendritischen Zellen in reife Zellen durch Zell-Zell-Kontakte mit reifen 4-1BBL⁺-Zellen ohne die Interaktion mit T-Zellen. Ein solch „autokriner“ Aktivierungsmechanismus könnte neben der konventionellen 4-1BB/4-1BBL-Stimulation von 4-1BB⁺-T-Zellen durch reife dendritischen Zellen von sehr großer Bedeutung für die Biologie der dendritischen Zellen bzw. der Regulation des Immunsystems sein. Wegen dieser möglichen Rolle von 4-1BB/4-1BBL bei der Aufrechterhaltung einer spezifischen Immunantwort sind neue Erkenntnisse auch für immuntherapeutische Ansätze wichtig.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Futagawa et al.²¹⁴ und Wilcox et al.²¹⁵ konnte durch die Aktivierung von 4-1BB auf dendritischen Zellen durch den Transfer von 4-1BBL die Expression von MHC II, CD80 und CD86 erhöht werden (siehe Tab. 3.5). Die Untersuchung des *in vivo* Effektes von 4-1BBL auf das stimulatorische Potential der dendritischen Zellen erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Tan et al.²¹¹, die zeigte, daß das kostimulatorische 4-1BB/4-1BBL-Signal von besonderer Bedeutung für die T-Zellstimulation ist, wenn die Menge des Antigens limitierend ist. Aus diesem Grund wurden Ad4-1BBL-infizierte dendritische Zellen mit unterschiedlichen MOIs von AdE7 koinfiziert, da die Stärke der H-2D^b-restringierten E7-spezifischen T-Zellantwort proportional zur verwendeten MOI von AdE7 ist (siehe Abb. 3.28 und Abb. 3.30). Unter diesen Bedingungen konnten die Ergebnisse von Tan et al.²¹¹ bestätigt werden, denn der Transfer von 4-1BBL führte nur unter Antigen-limitierenden Bedingungen zu einer signifikanten Verbesserung des immunstimulatorischen Potentials der dendritischen Zellen (siehe Abb. 3.33). Die H-2D^b-restringierte Effektor- und *memory* T-Zellantwort gegen E7 war nach Immunisierung mit Ad4-1BBL-infizierten dendritischen Zellen, die mit einer MOI von 50 bzw. 125 für AdE7 koinfiziert wurden, signifikant höher als mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen. Dagegen konnte keine Verbesserung der durch die dendritischen Zellen induzierten E7-spezifischen T-Zellantwort durch den Transfer von 4-1BBL beobachtet werden, wenn AdE7 mit einer unter den experimentellen Bedingungen optimalen MOI 250 verwendet wurde. Dieser Effekt von 4-1BBL auf die E7-spezifische T-Zellantwort unter Antigen-limitierenden Bedingungen könnte auf die durch 4-1BBL induzierte Expressionszunahme von CD80 und CD86 in den dendritischen Zellen (siehe Abb. 3.22) zurückzuführen sein. Die Auswertung der *ex vivo* IFN γ -ELISPOTs deutete jedoch darauf hin, daß dieser Effekt von 4-1BBL, die immunstimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen zu verbessern, möglicherweise auch noch auf andere Mechanismen als die Erhöhung der CD80- und CD86-Expression beruht, wie unter 4.3.4 diskutiert wird.

Die Ergebnisse der induzierten E7-spezifischen T-Zellantwort zeigen, daß die *in vitro* Modifikation der dendritischen Zellen durch den Transfer von 4-1BBL zu einer Verbesserung ihrer stimulatorischen Eigenschaft führt, die insbesondere für die Nutzung dendritischer Zellen als Adjuvants für die Entwicklung einer effektiven Immuntherapie gegen Tumore sehr interessant ist.

4.3.2 Effekt der Expression von RANK/RANKL auf die E7-spezifische T-Zellantwort

Wie 4-1BBL konnte auch durch den Transfer des kostimulatorischen TNF/TNFR-Paares RANK/RANKL in AdE7-infizierte dendritische Zellen deren stimulatorisches Potential unter Antigen-limitierenden Bedingungen signifikant verbessert werden. Die Initiation einer H-2D^b-restringierten E7-spezifischen Effektor- und *memory* T-Zellantwort durch die Immunisierung mit dendritischen Zellen konnte bei einer MOI von 125 für AdE7 zur Infektion der dendritischen Zellen signifikant durch RANK/RANKL erhöht werden (siehe Abb. 3.34), nicht jedoch bei einer MOI von 250 für AdE7 (siehe Abb. 3.36). Diese Erhöhung der E7-spezifischen Immunantwort durch RANK/RANKL ist der erste *in vivo* Nachweis eines immunstimulatorischen Effektes von RANK/RANKL auf die Initiation einer zytotoxischen CD8⁺ T-Zellantwort.

In vitro konnte durch die Behandlung mit RANKL als rekombinantes Protein die stimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen zur Aktivierung von T-Zellen positiv beeinflusst werden^{196,197}. Dieser positive Effekt wurde auf die anti-apoptotische Wirkung von RANK/RANKL auf dendritische Zellen zurückgeführt, die in direktem Zusammenhang mit der Induktion der Bcl-x_L-Expression steht³²⁴ und eine verlängerte Interaktion zwischen der dendritischen Zelle und der T-Zelle ermöglicht²⁰³. Die Immunisierung von Mäusen mit RANKL-behandelten dendritischen Zellen zeigte, daß dieser anti-apoptotische Effekt auch *in vivo* das Überleben der dendritischen Zellen erhöht, die Proliferation von spezifischen CD4⁺ T-Zellen verbessert und die Produktion der von T-Zellen sezernierten Zytokine IFN γ und IL-4 steigert²⁰⁴. Zusätzlich induziert RANK/RANKL in dendritischen Zellen die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1 sowie der für T-Zellwachstum und -differenzierung wichtigen Zytokine IL-12 und IL-15, was auch zu der Verbesserung des stimulatorischen Potentials der Zellen führen kann¹²⁴.

Im Gegensatz zu Wong et al.¹⁹⁷ konnte durch den Transfer von RANK/RANKL bzw. RANKL die Differenzierung der dendritischen Zellen induziert werden; die Expression von MHC II, CD80 und CD86 nahm deutlich zu (siehe Tab. 3.5). Daher könnte die Erhöhung der E7-spezifischen T-Zellantwort durch RANK/RANKL neben dem anti-apoptotischen Effekt³²⁴ und der Produktion von Zytokinen¹²⁴ auch auf der Differenzierung der dendritischen Zellen bzw. der Aktivierung der CD80- und CD86-Expression beruhen. Da nach Aktivierung der dendritischen Zellen mit RANKL als rekombinantes Protein kein Effekt auf den Differenzierungszustand bzw. der Expression von MHC II, CD80, CD86 und CD54 beobachtet wurde¹⁹⁷, scheint die genetische Modifikation mit RANK/RANKL zu einer effizienter Aktivierung der dendritischen Zellen und ihres stimulatorischen Potentials zu führen. Möglicherweise wird der Effekt von RANKL als rekombinantes Protein durch das endogene Expressionsniveau von RANK in dendritischen Zellen limitiert, denn durch den zusätzlichen Transfer von RANK konnte der positive Effekt von

RANKL weiter gesteigert werden. Somit scheint wegen der Erhöhung des endogenen Expressionsniveaus der gleichzeitige Transfer von Rezeptor und Ligand von Vorteil zu sein, um die effiziente Differenzierung und Verbesserung der stimulatorischen Eigenschaft der dendritischen Zellen zu garantieren.

Die RANK/RANKL-Ergebnisse sind aber noch aus einem weiteren Grund interessant, da sie zeigen, daß auch durch die Modifikation des endogenen Expressionsniveaus von RANK die stimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen verbessert werden kann. Die Ergebnisse in Abb. 3.35 zeigen, daß sowohl der Transfer der endogen in T-Zellen exprimierten Liganden (RANKL/CD40L) als auch der endogen in dendritischen Zellen exprimierten Rezeptoren (RANK/CD40) in AdE7- (MOI 125) infizierten dendritischen Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der Effektor- und *memory* T-Zellantwort gegen E7 führt. Im Vergleich zu der Immunantwort mit RANK/RANKL, war der gemeinsame Transfer von Rezeptor und Ligand für die Steigerung der Effektor-T-Zellantwort effizienter, allerdings konnte für die *memory* T-Zellantwort kein Unterschied festgestellt werden, was vielleicht mit den bereits diskutierten Problemen mit der *in vitro* Restimulation zusammenhängen könnte (4.2.4). Aufgrund der Ergebnisse des Transfers von CD40/CD40L (4.3.3) wird vermutet, daß die Verbesserung der E7-spezifischen Immunantwort lediglich auf der Funktion von RANK bzw. RANKL und nicht auf CD40 bzw. CD40L beruht. Die FACS-Analyse der dendritischen Zellen nach Expression von CD40L/RANKL bzw. CD40/RANK zeigte, daß die Zunahme des Differenzierungszustands bzw. der Expression von MHC II, CD80 und CD86 und der Reduktion der CD11c⁻-Zellen größtenteils auf RANKL/CD40L beruhte (siehe Tab. 3.5). Der Transfer von RANK/CD40 führte nicht zur Reduktion der CD11c⁻-Zellen und nur zu einer geringeren Erhöhung der Expression von MHC II, CD80 und CD86. Daher könnte der Effekt von RANK/CD40 auch auf die Steigerung des endogenen Expressionsniveaus in dendritischen Zellen zurückgehen, wodurch die Interaktion *in vivo* mit RANKL/CD40L-exprimierenden T-Zellen verbessert werden könnte. Der gleichzeitigen Transfer von TNF/TNFR-Paaren scheint daher für die Optimierung der immunstimulatorischen Kapazität von dendritischen Zellen aus zwei Gründen vorteilhaft zu sein. Zum einen wird der positive Effekt der Liganden auf die Differenzierung der dendritischen Zellkultur *in vitro* durch den Transfer der Rezeptoren weiter erhöht, wodurch reifere, stimulatorischere dendritische Zellen generiert werden können, zum anderen führt die Erhöhung der Expressionsintensität der endogen in dendritischen Zellen exprimierten Rezeptoren vermutlich auch *in vivo* zu einer Verbesserung der Interaktion mit den T-Zellen, die den Liganden exprimieren, was ebenfalls die Initiation einer T-Zellantwort positiv beeinflussen kann.

Die Verbesserung der durch die dendritischen Zellen induzierten E7-spezifischen T-Zellantwort mit RANK/RANKL demonstriert, daß dieses TNF/TNFR-Paar für die Optimierung der stimulatorischen Eigenschaft von dendritischen Zellen und Entwicklung einer effektiveren Immuntherapie mit therapeutischem Nutzen sehr interessant ist.

4.3.3 Einfluß von CD40/CD40L auf die E7-spezifische T-Zellantwort

Obwohl die CD40/CD40L-Stimulation in vielen Protokollen zu Generierung dendritischer Zellen als Differenzierungsstimulus eingesetzt wird, hatte der Transfer von CD40/CD40L in dendritische Zellen keinen Einfluß auf die immunstimulatorische Eigenschaft der

Zellen, da bei der Koinfektion der dendritischen Zellen mit AdE7 (MOI 125) keine signifikante Veränderung der induzierten E7-spezifischen T-Zellantwort nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.34). Durch die Behandlung der dendritischen Zellen mit einem agonistischen CD40-spezifischen Antikörper konnte die Initiation einer zytotoxischen T-Zellantwort verbessert werden^{122,191,192}, weshalb das Ergebnis für den Transfer von CD40/CD40L unerwartet war. Dieser Unterschied zu den Ergebnissen anderer Arbeiten könnte auf das Antigen HPV-16 E7 zurückzuführen sein, da die Initiation einer E7-spezifischen T-Zellantwort restringiert durch H-2D^b unabhängig von CD4⁺-T-Zellen ist³⁰⁹ und CD40L in dieser T-Zellpopulation exprimiert wird¹²⁴. Somit könnte der Transfer von CD40/CD40L ohne Einfluß auf die Induktion der E7-spezifischen Immunantwort durch die dendritischen Zellen sein, könnte aber einen positiven Effekt auf die Immunantwort gegen ein anderes Antigen haben.

Daß es sich bei den isolierten cDNAs für CD40 (3.2.1.1) und CD40L (3.2.1.2) um inaktive Varianten handelt, scheint aus mehreren Gründen eher unwahrscheinlich: Für die Mutationen der CD40- bzw. CD40L-Sequenz konnten GenBank-Einträge gefunden werden und bei der von AdCD40L codierten CD40L-Variante ist die Funktionalität beschrieben³⁰¹. Auch die im FACS gezeigte Erhöhung der Expression von CD80 und CD86 in dendritischen Zellen durch CD40/CD40L (siehe Tab. 3.5) deuten darauf hin, daß die exprimierten Proteine funktionell sind. Da in der Literatur keine Information über den Einfluß der Mutation in CD40 auf die Funktion des Proteins zu finden sind, kann die Klonierung einer inaktiven Form nicht ausgeschlossen werden. Jedoch steht dann die endogene CD40-Expression der dendritischen Zellen¹⁵⁸ zur Aktivierung der Zellen nach dem Transfer von CD40L zur Verfügung. Daher scheint das Ergebnis des Transfers von CD40/CD40L auf die durch die dendritischen Zellen induzierte Immunantwort eher auf das verwendete Antigen zurückzuführen sein als auf die Expression inaktiver CD40- bzw. CD40L-Varianten.

Um dieses für eine HPV-16-spezifische Immuntherapie interessante Ergebnis zu bestätigen, müssen jedoch noch weitere Versuche durchgeführt werden, welche die Funktionalität von CD40 und CD40L eindeutig demonstrieren. Dies könnte durch Komplementierungsversuche mit AdCD40 bzw. AdCD40L in dendritischen Zellen aus CD40^{-/-}-¹⁸⁷ bzw. CD40L^{-/-}-Mäusen¹⁸⁸ erfolgen. Aber auch die Untersuchung des Einflusses von CD40/CD40L auf die Initiation einer T-Zellantwort gegen ein anderes Antigen als E7 sind notwendig, um die Ergebnisse von Fernando et al.³⁰⁹ zu bestätigen. Weitere Daten über CD40/CD40L sind auch für die Evaluierung der hier untersuchten TNF/TNFR-Paare als Differenzierungsstimuli notwendig.

4.3.4 Synergistischer Effekt von 4-1BBL und RANK/RANKL

Durch den Transfer der kostimulatorischen Moleküle 4-1BBL bzw. RANK/RANKL in dendritische Zellen konnte die durch die Zellen induzierte HPV-16 E7-spezifische T-Zellantwort signifikant erhöht werden. Die Verbesserung der immunstimulatorischen Eigenschaft der dendritischen Zellen durch diese TNF- bzw. TNFR-Moleküle konnte jedoch nur unter Antigen-limitierenden Bedingungen (MOI 50 bzw. 125 für AdE7) nachgewiesen werden, nicht aber bei einer MOI von 250 für AdE7 (siehe Abb. 3.36). Diese Abhängigkeit des kostimulatorischen Signals zur T-Zellaktivierung von der

Antigenkonzentration wurde bereits für 4-1BB/4-1BBL von Tan et al.²¹¹ gezeigt. Durch die Koexpression von RANK, RANKL und 4-1BBL konnte die stärkste Differenzierung der dendritischen Zellen anhand der Expressionszunahme von MHC II, CD80 und CD86 sowie die deutlichste Reduktion der CD11c-Zellen gezeigt werden (siehe 3.3.3). Daher wurde untersucht, ob die Kombination von 4-1BBL mit RANK und RANKL auch zu einer weiteren Verbesserung des stimulatorischen Potentials der dendritischen Zellen zur Initiation einer H-2D^b-restringierten T-Zellantwort gegen E7 führt, wenn die dendritischen Zellen mit einer MOI von 250 für AdE7 koinfiziert werden.

Die Versuche zur Untersuchung des synergistischen Effektes von 4-1BBL, RANK und RANKL bei optimalen Antigenkonzentrationen für das exprimierte E7 (MOI 250 für AdE7) zeigten, daß nur die Koexpression aller drei kostimulatorischen Moleküle zur Induktion einer noch effizienteren E7-spezifischen Effektor- und *memory* T-Zellantwort durch die dendritischen Zellen führte, nicht jedoch 4-1BBL bzw. RANK/RANKL allein (siehe Abb. 3.36). Diese weitere Verbesserung der dendritischen Zellen durch den Transfer von 4-1BBL, RANK und RANKL könnte auf die im Vergleich zu 4-1BBL bzw. RANK/RANKL stärkste Erhöhung der Expression von MHC II, CD80 und CD86 beruhen. Basierend auf den Ergebnissen zur Untersuchung des Effektes der kostimulatorischen Moleküle RANK, RANKL und 4-1BBL auf die Fähigkeit der dendritischen Zellen zur Initiation einer E7-spezifischen Immunantwort könnte vermutet werden, daß in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration bestimmte Schwellenwerte für die untersuchten Oberflächenproteine erreicht werden müssen, um auch einen Effekt auf die stimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen zu besitzen.

Bislang sind keine vergleichbaren Arbeiten zur Kombination von kostimulatorischen Molekülen der TNF- bzw. TNFR-Superfamilie zur Optimierung der stimulatorischen Eigenschaft von dendritischen Zellen durchgeführt worden. Von Josien et al.¹²⁴ wurde jedoch gezeigt, daß die Kombination von RANKL mit CD40L und/oder TNF- α die Überlebensrate von dendritischen Zellen weiter steigern kann als RANK, CD40L oder TNF- α allein. Neben der anti-apoptotischen Wirkung könnte aber auch die durch 4-1BB/4-1BBL^{214,215} bzw. RANK/RANKL¹²⁴ induzierte Produktion von Zytokinen durch die Kombination weiter erhöht werden. Daher könnte der Effekt der Koexpression von RANK, RANKL und 4-1BBL auf die E7-spezifische Immunantwort zusätzlich zu der deutlichsten Erhöhung der CD80- und CD86-Expression auch auf eine weitere Verbesserung der anti-apoptotischen Wirkung und Produktion von Zytokinen in dendritischen Zellen zurückgehen.

Da durch die Aktivierung der dendritischen Zellen mit 4-1BBL, RANK und RANKL die Differenzierung der Zellen induziert wird, ist die Beteiligung von weiteren Mechanismen als die im FACS untersuchten Oberflächenproteine, die anti-apoptotische Wirkung und Zytokine zur Verbesserung der Stimulation von T-Zellen sehr wahrscheinlich. Die im *ex vivo* IFN γ -ELISPOT beobachtete Reduktion der durch die dendritischen Zellen gleichzeitig induzierten unspezifischen Immunantwort, die vermutlich gegen FCS-spezifische CTL-Epitope gerichtet ist (siehe 4.2.4), durch 4-1BBL deutet darauf hin. Hierbei zeigte sich, daß durch die Koinfektion der dendritischen Zellen mit AdE7 und Ad4-1BBL die Anzahl der unspezifisch IFN γ -sekretierenden Zellen in Abwesenheit des 8Q-Peptides im Vergleich zu den Gruppen, die nicht mit Ad4-1BBL-koinfizierten dendritischen Zellen immunisiert

wurden, deutlich abnahm (Abb. 3.37 A). Diese Reduktion konnte nicht durch den Transfer von RANK/RANKL beobachtet werden (Abb. 3.37 B), der nur zu einer generellen Erhöhung der IFN γ -sekretierenden Zellen sowohl bei Anwesenheit als auch bei Abwesenheit des Peptides führte. Wenn AdRANK und AdRANKL mit Ad4-1BBL zur Koinfektion der dendritischen Zellen kombiniert wurde, konnte erneut die auf 4-1BBL beruhende Abnahme der E7-unspezifisch IFN γ -sekretierenden Zellen, beobachtet werden (Abb. 3.37 C). Da diese Reduktion der unspezifischen Immunantwort nicht mit RANK/RANKL beobachtet wurde, scheinen die untersuchten TNF/TNFR-Paare möglicherweise auch unterschiedliche Effekte auf die Biologie der dendritischen Zellen und damit auf die immunstimulatorische Eigenschaft der Zellen zu haben. Worauf diese Reduktion der unspezifischen Immunantwort durch 4-1BBL beruht, ist nicht bekannt. Vielleicht könnte dieser Effekt von 4-1BBL auf den unter 4.3.1 diskutierten möglichen „autokrinen“ Aktivierungsmechanismus der dendritischen Zellen zurückgehen. Es bestätigt jedoch die besondere Rolle von 4-1BB/4-1BBL als kostimulatorisches Signal für T-Zellen und Differenzierungssignal für dendritischen Zellen²¹⁶.

4.4 Schlußfolgerung und Ausblick

Der hier demonstrierte Weg einer „kombinatorischen“ Immuntherapie mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen, die neben dem Antigen auch kostimulatorische Moleküle exprimieren, könnte durch die Optimierung der stimulatorischen Eigenschaften der dendritischen Zellen von großen therapeutischen Nutzen für den Einsatz dieser Zellen als natürliches Adjuvants in Immuntherapien sein. Die kombinatorische Immuntherapie könnte auch das Problem lösen, die immunologischen Toleranz gegenüber den Tumor durchbrechen zu müssen, um eine effektive Immunantwort zu induzieren.

Nun muß untersucht werden, ob die Steigerung des stimulatorischen Potentials der dendritischen Zellen durch 4-1BBL, RANK und RANKL auch im E7-transgenen Mausmodell, in dem die E7-spezifischen T-Zellen anerg bzw. tolerant sind^{276,277}, einen therapeutischen Nutzen hat. Kann durch die kombinatorische Immuntherapie die periphere Toleranz durchbrochen und eine E7-spezifische Immunantwort induziert werden, die zu einer Tumormunität führt, indem das Wachstum eines E7-transformierten Tumors bzw. die Entwicklung spontaner Tumore verhindert wird? Bei einem Erfolg der kombinatorischen Immuntherapie im E7-transgenen Mausmodell sollte versucht werden, die Ergebnisse auf das Humansystem zu übertragen. Trotz Gemeinsamkeiten des E7-transgenen Mausmodells mit der Situation in Patientinnen mit Zervixkarzinom, die ebenfalls eine immunologische Toleranz gegenüber Antigenen von HPV aufweisen, stellt sich die Frage der Vergleichbarkeit von artifiziellen Mausmodellen mit der komplexeren Situation in Menschen. Aber auch die Anwendung der kombinatorischen Immuntherapie mit dendritischen Zellen für andere Tumore oder chronische Infektionskrankheiten muß untersucht werden.

Weiterhin muß näher betrachtet werden, welche unterschiedlichen Mechanismen die TNF/TNFR-Paare zur Verbesserung des stimulatorischen Potentials der dendritischen Zellen nutzen. Insbesondere 4-1BB/4-1BBL, die wegen ihres einzigartigen Expressionsprofils von sehr großer Bedeutung für die Biologie der dendritischen Zellen und damit für

die Regulation des Immunsystems sein könnten, müssen im Zentrum dieser Arbeiten stehen, da sie neue Erkenntnisse über die Aufrechterhaltung und Dauer einer spezifischen Immunantwort liefern könnten.

5 Zusammenfassung

Wegen ihrer stimulatorischen Fähigkeit stehen dendritische Zellen im Mittelpunkt heutiger Immuntherapien gegen Tumor- und chronische Virusinfektionen. Tumore und Viren besitzen jedoch Strategien, der Kontrolle des Immunsystems durch die Induktion einer immunologischen Toleranz zu entgehen. So ist die Optimierung der stimulatorischen Eigenschaft von dendritischen Zellen von Bedeutung, um die Toleranz zu durchbrechen und eine effektive Immunantwort zu initiieren. Die Möglichkeit der Initiation und Verstärkung einer Immunantwort gegen Antigene des humanen Papillomavirus (HPV) durch Vakzinierung mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen ist das Thema dieser Arbeit.

HPVs, besonders HPV-16, sind mit Zervixkarzinomen assoziiert und das virale Onkogen E7 stellt ein ideales tumorspezifisches Antigen dar. Die Integration des Hauptkapsidproteins L1 in eine Immuntherapie bietet zusätzlich einen prophylaktischen Nutzen, da protektive Antikörper induziert werden können. Die Initiation einer Immunantwort gegen HPV-16 durch Immunisierung mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen sowie der Einfluß von kostimulatorischen Molekülen der TNF-/TNFR-Superfamilie auf die stimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen wurden in einem transgenen Mausmodell untersucht, das die Untersuchung humaner (HLA-A*0201) und muriner (H-2D^b) T-Zellantworten erlaubte.

Dendritische Zellen wurden *in vitro* mit GM-CSF+IL-4 aus Knochenmarkszellen generiert. Für die *ex vivo* Modifikation wurden adenovirale Vektoren hergestellt, die Antigene (HPV-16 E7, L1 und L1/E7) bzw. kostimulatorische Moleküle (CD40, CD40L, RANK, RANKL, 4-1BBL) codieren. Die dendritischen Zellen ließen sich effizient mit den adenoviralen Vektoren infizieren und exprimierten das Transgen für mindestens sechs Tage.

Durch Immunisierung mit AdE7-infizierten dendritischen Zellen konnte die Initiation einer H-2D^b-restringierten T-Zellantwort gegen E7 nachgewiesen werden, die proportional zur verwendeten MOI von AdE7 war und von der Stabilität des exprimierten Antigens abhing. Obwohl das Modell für die A2.1-restringierte T-Zellantwort nicht optimal ist, konnte mit AdL1-infizierten dendritischen Zellen eine A2.1-restringierte T-Zellantwort gegen L1 initiiert werden. Eine Antikörperantwort gegen L1 konnte nicht detektiert werden.

Der zusätzliche Transfer von 4-1BBL bzw. RANK und RANKL in dendritische Zellen verstärkte die E7-spezifische T-Zellantwort unter Antigen-limitierenden Bedingungen. Dieser Effekt auf die stimulatorische Eigenschaft der dendritischen Zellen könnte auf der Erhöhung der Expression von MHC II, CD80 und CD86 beruhen. Die Koexpression von 4-1BBL, RANK und RANKL in dendritischen Zellen induzierte die stärkste Erhöhung von MHC II, CD80 und CD86 und führte sogar zu einer Erhöhung der T-Zellantwort gegen E7 unter nicht Antigen-limitierenden Bedingungen.

Die dargestellte „kombinatorische“ Immuntherapie mit genetisch modifizierten dendritischen Zellen, die neben dem Antigen auch kostimulatorische Moleküle exprimieren, könnte von großem therapeutischen Nutzen sein. Durch die optimale Nutzung der dendritischen Zellen als natürliches Adjuvants könnte das Problem einer effektiven Immuntherapie, die immunologische Toleranz zu durchbrechen, gelöst werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Blaese,R.M. Steps toward gene therapy: 2. Cancer and AIDS. *Hosp. Pract. (Off Ed)* **30**, 37-45 (1995).
2. Hanahan,D. & Weinberg,R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
3. Shankaran,V. *et al.* IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107-1111 (2001).
4. Modrow,S.F.D. Molekulare Virologie. Spektrum Akad. Verlag GmbH Heidelberg - Berlin, (1998).
5. zur,H.H. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **122**, 3-13 (1996).
6. Boshoff,C. & Weiss,R. AIDS-related malignancies. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 373-382 (2002).
7. Disis,M.L. & Cheever,M.A. Oncogenic proteins as tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 637-642 (1996).
8. Ciuffo,G. Imnfesto positivo con filtrato di verruca volgare. *Giorn Ital Mal Venereol* **48**, 12-12 (1907).
9. Shope,R.E. & Hurst,E.W. Infectious papillomatosis of rabbits; with a note on the histopathology. *J. Exp. Med.* **58**, 607-624 (1933).
10. de Villiers,E.M. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **186**, 1-12 (1994).
11. Durst,M., Dzarlieva-Petrusevska,R.T., Boukamp,P., Fusenig,N.E. & Gissmann,L. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* **1**, 251-256 (1987).
12. Pirisi,L., Yasumoto,S., Feller,M., Doniger,J. & DiPaolo,J.A. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J. Virol.* **61**, 1061-1066 (1987).
13. Orth,G., Jablonska,S., Breitburd,F., Favre,M. & Croissant,O. The human papillomaviruses. *Bull. Cancer* **65**, 151-164 (1978).
14. zur,H.H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta* **1288**, F55-F78 (1996).

15. Boshart,M. *et al.* A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* **3**, 1151-1157 (1984).
16. Durst,M., Gissmann,L., Ikenberg,H. & zur,H.H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **80**, 3812-3815 (1983).
17. Murthy,N.S. & Mathew,A. Risk factors for pre-cancerous lesions of the cervix. *Eur. J. Cancer Prev.* **9**, 5-14 (2000).
18. zur,H.H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* **184**, 9-13 (1991).
19. Landis,S.H., Murray,T., Bolden,S. & Wingo,P.A. Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J. Clin.* **48**, 6-29 (1998).
20. Parkin,D.M., Pisani,P. & Ferlay,J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int. J. Cancer* **80**, 827-841 (1999).
21. Walboomers,J.M. *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* **189**, 12-19 (1999).
22. IACR Monograph. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 64. Human papillomaviruses. Lyon, France:IARC, 1995.
23. Bonneze,W. Clinical Virology. Richman,D.D., Whitley,R.J. & Hayden,F.G. (eds.), pp. 569-611 (ASM Press,2002).
24. Brown,D.R. *et al.* Human papillomavirus type 11 E1--E4 and L1 proteins colocalize in the mouse xenograft system at multiple time points. *Virology* **214**, 259-263 (1995).
25. Tindle,R.W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 59-65 (2002).
26. Wilke,C.M. *et al.* FRA3B extends over a broad region and contains a spontaneous HPV16 integration site: direct evidence for the coincidence of viral integration sites and fragile sites. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 187-195 (1996).
27. Scheffner,M., Werness,B.A., Huibregtse,J.M., Levine,A.J. & Howley,P.M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129-1136 (1990).
28. Tommasino,M. & Crawford,L. Human papillomavirus E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle. *Bioessays* **17**, 509-518 (1995).
29. McIntyre,M.C., Ruesch,M.N. & Laimins,L.A. Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology* **215**, 73-82 (1996).

30. Mullokandov, M.R. *et al.* Genomic alterations in cervical carcinoma: losses of chromosome heterozygosity and human papilloma virus tumor status. *Cancer Res.* **56**, 197-205 (1996).
31. Xiong, Y. *et al.* Alteration of cell cycle kinase complexes in human papillomavirus E6- and E7-expressing fibroblasts precedes neoplastic transformation. *J. Virol.* **70**, 999-1008 (1996).
32. Tan, T.M. & Ting, R.C. In vitro and in vivo inhibition of human papillomavirus type 16 E6 and E7 genes. *Cancer Res.* **55**, 4599-4605 (1995).
33. von Knebel, D.M., Rittmuller, C., zur, H.H. & Durst, M. Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA. *Int. J. Cancer* **51**, 831-834 (1992).
34. Crook, T., Morgenstern, J.P., Crawford, L. & Banks, L. Continued expression of HPV-16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells co-transformed by HPV-16 plus EJ- ras. *EMBO J.* **8**, 513-519 (1989).
35. von Knebel, D.M., Oltersdorf, T., Schwarz, E. & Gissmann, L. Correlation of modified human papilloma virus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical carcinoma cells. *Cancer Res.* **48**, 3780-3786 (1988).
36. DiMaio, D., Guralski, D. & Schiller, J.T. Translation of open reading frame E5 of bovine papillomavirus is required for its transforming activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**, 1797-1801 (1986).
37. Leechanachai, P., Banks, L., Moreau, F. & Matlashewski, G. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene* **7**, 19-25 (1992).
38. Bosch, F.X. *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 796-802 (1995).
39. Burghardt, E., Webb, M.J., Monaghan, J.M. & Kindermann, G. Surgical Gynecologic Oncology. Thieme, Stuttgart, 1993.
40. Köchli, O.R., Sevin, B.U., Benz, J., Petru, E. & Haller, U. Gynäkologische Onkologie. Springer, Berlin. 1998.
41. Ho, G.Y., Burk, R.D., Fleming, I. & Klein, R.S. Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Int. J. Cancer* **56**, 788-792 (1994).
42. Petry, K.U. *et al.* Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Int. J. Cancer* **57**, 836-840 (1994).
43. Halpert, R. *et al.* Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstet. Gynecol.* **68**, 251-258 (1986).

44. Reddehase, M.J. *et al.* Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J. Virol.* **55**, 264-273 (1985).
45. Burnet, F.M. Cancer-a biological approach. *Brit. Med. J.* **1**, 841-847 (1957).
46. Burnet, F.M. The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* **13**, 1-27 (1970).
47. Thomas, L. Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive State. Lawrence, H.S. (ed.), pp. 529-532 (Hoeber-Haber, New York, 1959).
48. Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J. & Schreiber, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**, 991-998 (2002).
49. Birkeland, S.A. *et al.* Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964- 1986. *Int. J. Cancer* **60**, 183-189 (1995).
50. Gatti, R.A. & Good, R.A. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* **28**, 89-98 (1971).
51. Van Pel, A. & Boon, T. Protection against a nonimmunogenic mouse leukemia by an immunogenic variant obtained by mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **79**, 4718-4722 (1982).
52. Cheever, M.A. *et al.* Immunity to oncogenic proteins. *Immunol. Rev.* **145**, 33-59 (1995).
53. Rosenberg, S.A., Kawakami, Y., Robbins, P.F. & Wang, R. Identification of the genes encoding cancer antigens: implications for cancer immunotherapy. *Adv. Cancer Res.* **70**, 145-177 (1996).
54. Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 118-129 (2001).
55. Kessels, H.W., Wolkers, M.C. & Schumacher, T.N. Adoptive transfer of T-cell immunity. *Trends Immunol.* **23**, 264-269 (2002).
56. Dranoff, G. & Mulligan, R.C. Gene transfer as cancer therapy. *Adv. Immunol.* **58**, 417-454 (1995).
57. Gilboa, E., Lyster, H.K., Vieweg, J. & Saito, S. Immunotherapy of cancer using cytokine gene-modified tumor vaccines. *Semin. Cancer Biol.* **5**, 409-417 (1994).
58. Schmidt-Wolf, I.G., Huhn, D., Neubauer, A. & Wittig, B. Interleukin-7 gene transfer in patients with metastatic colon carcinoma, renal cell carcinoma, melanoma, or with lymphoma. *Hum. Gene Ther.* **5**, 1161-1168 (1994).

59. Steinman,R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 271-296 (1991).
60. Bubenik,J. Gene transfer for immunotherapy of cancer. *Gene Ther.* **3**, 944-945 (1996).
61. Maeurer,M.J. *et al.* Tumor escape from immune recognition: loss of HLA-A2 melanoma cell surface expression is associated with a complex rearrangement of the short arm of chromosome 6. *Clin. Cancer Res.* **2**, 641-652 (1996).
62. Natali,P.G. *et al.* Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 6719-6723 (1989).
63. Barth,R.J., Jr., Camp,B.J., Martuscello,T.A., Dain,B.J. & Memoli,V.A. The cytokine microenvironment of human colon carcinoma. Lymphocyte expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-4 predicts improved survival. *Cancer* **78**, 1168-1178 (1996).
64. Pardoll,D.M. Cancer vaccines. *Immunol. Today* **14**, 310-316 (1993).
65. Mackiewicz,A. & Rose-John,S. More about genetically modified tumour vaccines. *Gene Ther.* **5**, 147-148 (1998).
66. Lee,P.P. *et al.* Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat. Med.* **5**, 677-685 (1999).
67. Janeway,C.A. & Travers,P. Immunologie. Spectrum-Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford. 1995.
68. Pardoll,D.M. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 227-238 (2002).
69. Banchereau,J. & Steinman,R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252 (1998).
70. Steinman,R.M. & Cohn,Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* **137**, 1142-1162 (1973).
71. Williams,L.A., Egner,W. & Hart,D.N. Isolation and function of human dendritic cells. *Int. Rev. Cytol.* **153**, 41-103 (1994).
72. Steinman,R.M. & Witmer,M.D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **75**, 5132-5136 (1978).
73. McKenzie,J.L., Beard,M.E. & Hart,D.N. Depletion of donor kidney dendritic cells prolongs graft survival. *Transplant. Proc.* **16**, 948-951 (1984).

74. Hart,D.N., Prickett,T.C., McKenzie,J.L., Martin,M.L. & Beard,M.E. Characterization of interstitial dendritic cells in human tissues. *Transplant. Proc.* **21**, 401-403 (1989).
75. Steinman,R.M., Witmer-Pack,M. & Inaba,K. Dendritic cells: antigen presentation, accessory function and clinical relevance. *Adv. Exp. Med. Biol.* **329**, 1-9 (1993).
76. Caux,C. *et al.* B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **180**, 1841-1847 (1994).
77. Hart,D.N., Starling,G.C., Calder,V.L. & Fernando,N.S. B7/BB-1 is a leucocyte differentiation antigen on human dendritic cells induced by activation. *Immunology* **79**, 616-620 (1993).
78. Hart,D.N. & Prickett,T.C. Intercellular adhesion molecule-2 (ICAM-2) expression on human dendritic cells. *Cell Immunol.* **148**, 447-454 (1993).
79. Knight,S.C. *et al.* The role of dendritic cells in the initiation of immune responses to contact sensitizers. I. In vivo exposure to antigen. *Cell Immunol.* **94**, 427-434 (1985).
80. Crow,M.K. & Kunkel,H.G. Human dendritic cells: major stimulators of the autologous and allogeneic mixed leucocyte reactions. *Clin. Exp. Immunol.* **49**, 338-346 (1982).
81. Thomas,R., Davis,L.S. & Lipsky,P.E. Comparative accessory cell function of human peripheral blood dendritic cells and monocytes. *J. Immunol.* **151**, 6840-6852 (1993).
82. Austyn,J.M. *et al.* Isolation and characterization of dendritic cells from mouse heart and kidney. *J. Immunol.* **152**, 2401-2410 (1994).
83. Egner,W., McKenzie,J.L., Smith,S.M., Beard,M.E. & Hart,D.N. Identification of potent mixed leukocyte reaction-stimulatory cells in human bone marrow. Putative differentiation stage of human blood dendritic cells. *J. Immunol.* **150**, 3043-3053 (1993).
84. Lu,L. *et al.* Propagation of dendritic cell progenitors from normal mouse liver using granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and their maturational development in the presence of type-1 collagen. *J. Exp. Med.* **179**, 1823-1834 (1994).
85. Spencer,S.C. & Fabre,J.W. Characterization of the tissue macrophage and the interstitial dendritic cell as distinct leukocytes normally resident in the connective tissue of rat heart. *J. Exp. Med.* **171**, 1841-1851 (1990).
86. Stingl,G., Romani,N. & Wolff,K. Langerhans' cells: a distinctive member of bone marrow-derived dendritic cells. *Adv. Dermatol.* **2**, 269-281 (1987).

87. Cella,M., Engering,A., Pinet,V., Pieters,J. & Lanzavecchia,A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388**, 782-787 (1997).
88. Nijman,H.W. *et al.* Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J. Exp. Med.* **182**, 163-174 (1995).
89. Inaba,K. *et al.* Immunologic properties of purified epidermal Langerhans cells. Distinct requirements for stimulation of unprimed and sensitized T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **164**, 605-613 (1986).
90. Hock,B.D., Starling,G.C., Daniel,P.B. & Hart,D.N. Characterization of CMRF-44, a novel monoclonal antibody to an activation antigen expressed by the allostimulatory cells within peripheral blood, including dendritic cells. *Immunology* **83**, 573-581 (1994).
91. Katz,S.I., Tamaki,K. & Sachs,D.H. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* **282**, 324-326 (1979).
92. Shortman,K. *et al.* The linkage between T-cell and dendritic cell development in the mouse thymus. *Immunol. Rev.* **165**, 39-46 (1998).
93. Romani,N. *et al.* Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* **180**, 83-93 (1994).
94. Wu,L., Li,C.L. & Shortman,K. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J. Exp. Med.* **184**, 903-911 (1996).
95. Ardavin,C., Wu,L., Ferrero,I. & Shortman,K. Mouse thymic dendritic cell subpopulations. *Immunol. Lett.* **38**, 19-25 (1993).
96. Bjoreck,P. & Kincade,P.W. CD19+ pro-B cells can give rise to dendritic cells in vitro. *J. Immunol.* **161**, 5795-5799 (1998).
97. Ardavin,C. Thymic dendritic cells. *Immunol. Today* **18**, 350-361 (1997).
98. Carlow,D.A., van Oers,N.S., Teh,S.J. & Teh,H.S. Deletion of antigen-specific immature thymocytes by dendritic cells requires LFA-1/ICAM interactions. *J. Immunol.* **148**, 1595-1603 (1992).
99. Pulendran,B. *et al.* Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J. Immunol.* **159**, 2222-2231 (1997).
100. Vremec,D. & Shortman,K. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J. Immunol.* **159**, 565-573 (1997).

101. Manz,M.G., Traver,D., Miyamoto,T., Weissman,I.L. & Akashi,K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* **97**, 3333-3341 (2001).
102. Traver,D. *et al.* Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* **290**, 2152-2154 (2000).
103. Wu,L., Vandenabeele,S. & Georgopoulos,K. Derivation of dendritic cells from myeloid and lymphoid precursors. *Int. Rev. Immunol.* **20**, 117-135 (2001).
104. Heath,W.R. & Carbone,F.R. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 126-134 (2001).
105. Shortman,K. & Liu,Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 151-161 (2002).
106. Steinman,R.M. & Swanson,J. The endocytic activity of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **182**, 283-288 (1995).
107. Sallusto,F., Cella,M., Danieli,C. & Lanzavecchia,A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**, 389-400 (1995).
108. Jiang,W. *et al.* The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **375**, 151-155 (1995).
109. Albert,M.L. *et al.* Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **188**, 1359-1368 (1998).
110. Inaba,K., Inaba,M., Naito,M. & Steinman,R.M. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med.* **178**, 479-488 (1993).
111. Moll,H., Fuchs,H., Blank,C. & Rollinghoff,M. Langerhans cells transport Leishmania major from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1595-1601 (1993).
112. Svensson,M., Pfeifer,J., Stockinger,B. & Wick,M.J. Bacterial antigen delivery systems: phagocytic processing of bacterial antigens for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *Behring Inst. Mitt.* 197-211 (1997).
113. Matsuno,K., Ezaki,T., Kudo,S. & Uehara,Y. A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *J. Exp. Med.* **183**, 1865-1878 (1996).
114. Rescigno,M., Granucci,F., Citterio,S., Foti,M. & Ricciardi-Castagnoli,P. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol. Today* **20**, 200-203 (1999).

115. Hartmann,G., Weiner,G.J. & Krieg,A.M. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 9305-9310 (1999).
116. Cella,M. *et al.* Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J. Exp. Med.* **189**, 821-829 (1999).
117. Roake,J.A. Pathways of dendritic cell differentiation and development. *Eye* **9** (Pt 2), 161-166 (1995).
118. Cumberbatch,M. & Kimber,I. Dermal tumour necrosis factor-alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration. *Immunology* **75**, 257-263 (1992).
119. Allavena,P. *et al.* IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur. J. Immunol.* **28**, 359-369 (1998).
120. Macatonia,S.E., Knight,S.C., Edwards,A.J., Griffiths,S. & Fryer,P. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J. Exp. Med.* **166**, 1654-1667 (1987).
121. Yoshida,T. & Takaya,K. Disappearance of the antigen exchanging ability of FDC induced by repeated antigen injections. *Adv. Exp. Med. Biol.* **417**, 499-502 (1997).
122. Bennett,S.R. *et al.* Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* **393**, 478-480 (1998).
123. Flynn,S., Toellner,K.M., Raykundalia,C., Goodall,M. & Lane,P. CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1. *J. Exp. Med.* **188**, 297-304 (1998).
124. Josien,R., Wong,B.R., Li,H.L., Steinman,R.M. & Choi,Y. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J. Immunol.* **162**, 2562-2568 (1999).
125. Koch,F. *et al.* High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.* **184**, 741-746 (1996).
126. Sallusto,F. & Lanzavecchia,A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **179**, 1109-1118 (1994).
127. Pamer,E. & Cresswell,P. Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 323-358 (1998).

128. Rock,K.L. & Goldberg,A.L. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I- presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 739-779 (1999).
129. Inaba,K. *et al.* Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **188**, 2163-2173 (1998).
130. Kleijmeer,M. *et al.* Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J. Cell Biol.* **155**, 53-63 (2001).
131. Bates,E.E. *et al.* Identification and analysis of a novel member of the ubiquitin family expressed in dendritic cells and mature B cells. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2471-2477 (1997).
132. Bevan,M.J. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* **143**, 1283-1288 (1976).
133. Pfeifer,J.D. *et al.* Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* **361**, 359-362 (1993).
134. Lanzavecchia,A. Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 348-354 (1996).
135. Kurts,C., Kosaka,H., Carbone,F.R., Miller,J.F. & Heath,W.R. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J. Exp. Med.* **186**, 239-245 (1997).
136. Sigal,L.J., Crotty,S., Andino,R. & Rock,K.L. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* **398**, 77-80 (1999).
137. Inaba,K. *et al.* High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J. Exp. Med.* **186**, 665-672 (1997).
138. Steinman,R.M. & Inaba,K. Stimulation of the primary mixed leukocyte reaction. *Crit Rev. Immunol.* **5**, 331-348 (1985).
139. Bretscher,P. & Cohn,M. A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* **169**, 1042-1049 (1970).
140. Lenschow,D.J., Walunas,T.L. & Bluestone,J.A. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 233-258 (1996).
141. Chambers,C.A. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol.* **22**, 217-223 (2001).

142. Kwon,B., Youn,B.S. & Kwon,B.S. Functions of newly identified members of the tumor necrosis factor receptor/ligand superfamilies in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 340-345 (1999).
143. Guinan,E.C., Gribben,J.G., Boussiotis,V.A., Freeman,G.J. & Nadler,L.M. Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood* **84**, 3261-3282 (1994).
144. Flechner,E.R., Freudenthal,P.S., Kaplan,G. & Steinman,R.M. Antigen-specific T lymphocytes efficiently cluster with dendritic cells in the human primary mixed-leukocyte reaction. *Cell Immunol.* **111**, 183-195 (1988).
145. Valitutti,S., Muller,S., Cella,M., Padovan,E. & Lanzavecchia,A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* **375**, 148-151 (1995).
146. Viola,A., Schroeder,S., Sakakibara,Y. & Lanzavecchia,A. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* **283**, 680-682 (1999).
147. Heufler,C., Koch,F. & Schuler,G. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* **167**, 700-705 (1988).
148. Witmer-Pack,M.D., Olivier,W., Valinsky,J., Schuler,G. & Steinman,R.M. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* **166**, 1484-1498 (1987).
149. Metlay,J.P. *et al.* The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* **171**, 1753-1771 (1990).
150. Huleatt,J.W. & Lefrancois,L. Antigen-driven induction of CD11c on intestinal intraepithelial lymphocytes and CD8⁺ T cells in vivo. *J. Immunol.* **154**, 5684-5693 (1995).
151. Fanger,N.A., Wardwell,K., Shen,L., Tedder,T.F. & Guyre,P.M. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol.* **157**, 541-548 (1996).
152. Fanger,N.A. *et al.* Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc gamma RI (CD64) expressed on human blood dendritic cells. *J. Immunol.* **158**, 3090-3098 (1997).
153. Kampgen,E. *et al.* Class II major histocompatibility complex molecules of murine dendritic cells: synthesis, sialylation of invariant chain, and antigen processing capacity are down-regulated upon culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 3014-3018 (1991).

154. Banchereau,J. *et al.* The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 881-922 (1994).
155. Fagnoni,F.F. *et al.* Role of B70/B7-2 in CD4+ T-cell immune responses induced by dendritic cells. *Immunology* **85**, 467-474 (1995).
156. Steinbach,F., Krause,B., Blass,S., Burmester,G.R. & Hiepe,F. Development of accessory phenotype and function during the differentiation of monocyte-derived dendritic cells. *Res. Immunol.* **149**, 627-632 (1998).
157. Inaba,K. *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* **176**, 1693-1702 (1992).
158. Lutz,M.B. *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* **223**, 77-92 (1999).
159. Mercier,S. *et al.* Distinct roles of adenovirus vector-transduced dendritic cells, myoblasts, and endothelial cells in mediating an immune response against a transgene product. *J. Virol.* **76**, 2899-2911 (2002).
160. Schuler,G. & Steinman,R.M. Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J. Exp. Med.* **186**, 1183-1187 (1997).
161. Celluzzi,C.M., Mayordomo,J.I., Storkus,W.J., Lotze,M.T. & Falo,L.D., Jr. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J. Exp. Med.* **183**, 283-287 (1996).
162. Boon,T. *et al.* Genes coding for tumor rejection antigens: perspectives for specific immunotherapy. *Important Adv. Oncol.* 53-69 (1994).
163. Hsu,F.J. *et al.* Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen- pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* **2**, 52-58 (1996).
164. Inaba,K., Metlay,J.P., Crowley,M.T. & Steinman,R.M. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen- specific, MHC-restricted T cells in situ. *J. Exp. Med.* **172**, 631-640 (1990).
165. Nestle,F.O. *et al.* Vaccination of melanoma patients with pep. *Nat. Med.* **4**, 328-332 (1998).
166. Nair,S.K., Snyder,D., Rouse,B.T. & Gilboa,E. Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen- presenting cells pulsed with tumor extracts. *Int. J. Cancer* **70**, 706-715 (1997).
167. Gong,J., Chen,D., Kashiwaba,M. & Kufe,D. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat. Med.* **3**, 558-561 (1997).

168. Parmiani,G. Tumor immunity as autoimmunity: tumor antigens include normal self proteins which stimulate anergic peripheral T cells. *Immunol. Today* **14**, 536-538 (1993).
169. Tuting,T., DeLeo,A.B., Lotze,M.T. & Storkus,W.J. Genetically modified bone marrow-derived dendritic cells expressing tumor-associated viral or "self" antigens induce antitumor immunity in vivo. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2702-2707 (1997).
170. Nair,S.K. *et al.* Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat. Biotechnol.* **16**, 364-369 (1998).
171. Boczkowski,D., Nair,S.K., Snyder,D. & Gilboa,E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* **184**, 465-472 (1996).
172. Ludewig,B. *et al.* Rapid peptide turnover and inefficient presentation of exogenous antigen critically limit the activation of self-reactive ctl by dendritic cells. *J. Immunol.* **166**, 3678-3687 (2001).
173. Arthur,J.F. *et al.* A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells. *Cancer Gene Ther.* **4**, 17-25 (1997).
174. Dietz,A.B. & Vuk-Pavlovic,S. High efficiency adenovirus-mediated gene transfer to human dendritic cells. *Blood* **91**, 392-398 (1998).
175. Gong,J. *et al.* Induction of antigen-specific antitumor immunity with adenovirus-transduced dendritic cells. *Gene Ther.* **4**, 1023-1028 (1997).
176. Rea,D. *et al.* Adenoviruses activate human dendritic cells without polarization toward a T-helper type 1-inducing subset. *J. Virol.* **73**, 10245-10253 (1999).
177. Song,W. *et al.* Dendritic cells genetically modified with an adenovirus vector encoding the cDNA for a model antigen induce protective and therapeutic antitumor immunity. *J. Exp. Med.* **186**, 1247-1256 (1997).
178. Murakami,M., Gurski,K.J., Marincola,F.M., Ackland,J. & Steller,M.A. Induction of specific CD8+ T-lymphocyte responses using a human papillomavirus-16 E6/E7 fusion protein and autologous dendritic cells. *Cancer Res.* **59**, 1184-1187 (1999).
179. Overwijk,W.W. *et al.* Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 2982-2987 (1999).
180. Jenkins,M.K., Taylor,P.S., Norton,S.D. & Urdahl,K.B. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J. Immunol.* **147**, 2461-2466 (1991).

181. Linsley,P.S. *et al.* Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* **173**, 721-730 (1991).
182. Hurwitz,A.A., Kwon,E.D. & van Elsas,A. Costimulatory wars: the tumor menace. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 589-596 (2000).
183. Smith,C.A., Farrah,T. & Goodwin,R.G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**, 959-962 (1994).
184. Locksley,R.M., Killeen,N. & Lenardo,M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501 (2001).
185. Karin,M. & Lin,A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* **3**, 221-227 (2002).
186. Grewal,I.S. & Flavell,R.A. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 111-135 (1998).
187. Kawabe,T. *et al.* The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity.* **1**, 167-178 (1994).
188. Xu,J. *et al.* Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity.* **1**, 423-431 (1994).
189. Kennedy,M.K. *et al.* Induction of B cell costimulatory function by recombinant murine CD40 ligand. *Eur. J. Immunol.* **24**, 116-123 (1994).
190. Roy,M. *et al.* Studies on the interdependence of gp39 and B7 expression and function during antigen-specific immune responses. *Eur. J. Immunol.* **25**, 596-603 (1995).
191. Ridge,J.P., Di Rosa,F. & Matzinger,P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T- helper and a T-killer cell. *Nature* **393**, 474-478 (1998).
192. Schoenberger,S.P., Toes,R.E., van der Voort,E.I., Offringa,R. & Melief,C.J. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* **393**, 480-483 (1998).
193. Yang,Y. & Wilson,J.M. CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science* **273**, 1862-1864 (1996).
194. Diehl,L. *et al.* CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nat. Med.* **5**, 774-779 (1999).
195. Sotomayor,E.M. *et al.* Conversion of tumor-specific CD4+ T-cell tolerance to T-cell priming through in vivo ligation of CD40. *Nat. Med.* **5**, 780-787 (1999).

196. Anderson,D.M. *et al.* A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* **390**, 175-179 (1997).
197. Wong,B.R. *et al.* TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J. Exp. Med.* **186**, 2075-2080 (1997).
198. Theill,L.E., Boyle,W.J. & Penninger,J.M. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 795-823 (2002).
199. Darnay,B.G., Haridas,V., Ni,J., Moore,P.A. & Aggarwal,B.B. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor- associated factors and activation of NF-kappab and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 20551-20555 (1998).
200. Darnay,B.G., Ni,J., Moore,P.A. & Aggarwal,B.B. Activation of NF-kappaB by RANK requires tumor necrosis factor receptor- associated factor (TRAF) 6 and NF-kappaB-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif. *J. Biol. Chem.* **274**, 7724-7731 (1999).
201. Kim,H.H. *et al.* Receptor activator of NF-kappaB recruits multiple TRAF family adaptors and activates c-Jun N-terminal kinase. *FEBS Lett.* **443**, 297-302 (1999).
202. Wong,B.R. *et al.* The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *J. Biol. Chem.* **273**, 28355-28359 (1998).
203. Wong,B.R. *et al.* TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol. Cell* **4**, 1041-1049 (1999).
204. Josien,R. *et al.* TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* **191**, 495-502 (2000).
205. Kong,Y.Y. *et al.* OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **397**, 315-323 (1999).
206. Pollok,K.E. *et al.* Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J. Immunol.* **150**, 771-781 (1993).
207. DeBenedette,M.A., Shahinian,A., Mak,T.W. & Watts,T.H. Costimulation of CD28^{-/-} T lymphocytes by 4-1 ligand. *J. Immunol.* **158**, 551-559 (1997).
208. Maus,M.V. *et al.* Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB. *Nat. Biotechnol.* **20**, 143-148 (2002).
209. DeBenedette,M.A. *et al.* Analysis of 4-1BB ligand (4-1BBL)-deficient mice and of mice lacking both 4-1BBL and CD28 reveals a role for 4-1BBL in skin allograft rejection and in the cytotoxic T cell response to influenza virus. *J. Immunol.* **163**, 4833-4841 (1999).

210. Shuford,W.W. *et al.* 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J. Exp. Med.* **186**, 47-55 (1997).
211. Tan,J.T., Whitmire,J.K., Ahmed,R., Pearson,T.C. & Larsen,C.P. 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *J. Immunol.* **163**, 4859-4868 (1999).
212. Wilcox,R.A. *et al.* Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors. *J. Clin. Invest* **109**, 651-659 (2002).
213. Cooper,D., Bansal-Pakala,P. & Croft,M. 4-1BB (CD137) controls the clonal expansion and survival of CD8 T cells in vivo but does not contribute to the development of cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* **32**, 521-529 (2002).
214. Futagawa,T. *et al.* Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *Int. Immunol.* **14**, 275-286 (2002).
215. Wilcox,R.A. *et al.* Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. *J. Immunol.* **168**, 4262-4267 (2002).
216. Kwon,B., Lee,H.W. & Kwon,B.S. New insights into the role of 4-1BB in immune responses: beyond CD8+ T cells. *Trends Immunol.* **23**, 378-380 (2002).
217. Bachmann,M.F. *et al.* TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand- independent T helper cell activation. *J. Exp. Med.* **189**, 1025-1031 (1999).
218. Karpati,G., Lochmuller,H., Nalbantoglu,J. & Durham,H. The principles of gene therapy for the nervous system. *Trends Neurosci.* **19**, 49-54 (1996).
219. Robbins,P.D., Tahara,H. & Ghivizzani,S.C. Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol.* **16**, 35-40 (1998).
220. Suhr,S.T. & Gage,F.H. Gene therapy for neurologic disease. *Arch. Neurol.* **50**, 1252-1268 (1993).
221. Sutter,G. & Moss,B. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 10847-10851 (1992).
222. Shenk T. Fields Virology, third edition.1996.
223. Hilleman M.R. & Werner J.H. Recovery of new agents from patients with acuterespiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **85**: 183-188 (1954).
224. Rowe W.P., Huebner R.J., Gilmore L.K., Parrott R.H. & Ward T.G. Isolation of a cytopathogenic agent from human adnoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **84**, 570-573 (1953).

225. Robinson,A.J., Younghusband,H.B. & Bellett,A.J. A circula DNA-protein complex from adenoviruses. *Virology* **56**, 54-69 (1973).
226. Hong,S.S., Karayan,L., Tournier,J., Curiel,D.T. & Boulanger,P.A. Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO J.* **16**, 2294-2306 (1997).
227. Bergelson,J.M. *et al.* Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320-1323 (1997).
228. Davison,E., Kirby,I., Elliott,T. & Santis,G. The human HLA-A*0201 allele, expressed in hamster cells, is not a high- affinity receptor for adenovirus type 5 fiber. *J. Virol.* **73**, 4513-4517 (1999).
229. Dales,S. & Chardonnet,Y. Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement of the inoculum. *Virology* **56**, 465-483 (1973).
230. Yeh,P. & Perricaudet,M. Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology. *FASEB J.* **11**, 615-623 (1997).
231. Zabner,J. *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* **75**, 207-216 (1993).
232. Ali,M., Lemoine,N.R. & Ring,C.J. The use of DNA viruses as vectors for gene therapy. *Gene Ther.* **1**, 367-384 (1994).
233. Hitt,M., Bett,A.J., Addision,C.L., Prevec,L. & Graham,F.L. Techniques for human adenovirus vector construction and characterisation. *Methods Mol. Genet.* **7**, 1143-1151 (1995).
234. Graham,F.L. & Prevec,L. Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol. Biotechnol.* **3**, 207-220 (1995).
235. Yang,Y., Ertl,H.C. & Wilson,J.M. MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity.* **1**, 433-442 (1994).
236. Yang,Y. *et al.* Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. *Nat. Genet.* **7**, 362-369 (1994).
237. Yang,Y. *et al.* Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 4407-4411 (1994).
238. Tripathy,S.K., Black,H.B., Goldwasser,E. & Leiden,J.M. Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nat. Med.* **2**, 545-550 (1996).

239. Dai,Y. *et al.* Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 1401-1405 (1995).
240. Romano,G., Pacilio,C. & Giordano,A. Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals. *Stem Cells* **17**, 191-202 (1999).
241. Kochanek,S., Schiedner,G. & Volpers,C. High-capacity 'gutless' adenoviral vectors. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **3**, 454-463 (2001).
242. Parks,R.J. *et al.* A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 13565-13570 (1996).
243. Brossart,P., Goldrath,A.W., Butz,E.A., Martin,S. & Bevan,M.J. Virus-mediated delivery of antigenic epitopes into dendritic cells as a means to induce CTL. *J. Immunol.* **158**, 3270-3276 (1997).
244. Wan,Y., Bramson,J., Carter,R., Graham,F. & Gauldie,J. Dendritic cells transduced with an adenoviral vector encoding a model tumor-associated antigen for tumor vaccination. *Hum. Gene Ther.* **8**, 1355-1363 (1997).
245. Bett,A.J., Prevec,L. & Graham,F.L. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J. Virol.* **67**, 5911-5921 (1993).
246. Bett,A.J., Haddara,W., Prevec,L. & Graham,F.L. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 8802-8806 (1994).
247. Graham,F.L., Smiley,J., Russell,W.C. & Nairn,R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59-74 (1977).
248. McGrory,W.J., Bautista,D.S. & Graham,F.L. A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology* **163**, 614-617 (1988).
249. Chartier,C. *et al.* Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **70**, 4805-4810 (1996).
250. Graham,F.L., Rudy,J. & Brinkley,P. Infectious circular DNA of human adenovirus type 5: regeneration of viral DNA termini from molecules lacking terminal sequences. *EMBO J.* **8**, 2077-2085 (1989).
251. Hearing,P., Samulski,R.J., Wishart,W.L. & Shenk,T. Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *J. Virol.* **61**, 2555-2558 (1987).
252. Dirks,W., Wirth,M. & Hauser,H. Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells. *Gene* **128**, 247-249 (1993).

253. Macejak,D.G. & Sarnow,P. Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* **353**, 90-94 (1991).
254. Hohn,B. & Collins,J. A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene* **11**, 291-298 (1980).
255. Wahl,G.M. *et al.* Cosmid vectors for rapid genomic walking, restriction mapping, and gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**, 2160-2164 (1987).
256. Gossen,M. & Bujard,H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline- responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 5547-5551 (1992).
257. Deuschle,U., Meyer,W.K. & Thiesen,H.J. Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Mol. Cell Biol.* **15**, 1907-1914 (1995).
258. Yao,F. *et al.* Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* **9**, 1939-1950 (1998).
259. Breitburd,F. & Coursaget,P. Human papillomavirus vaccines. *Semin. Cancer Biol.* **9**, 431-444 (1999).
260. Lin,K.Y. *et al.* Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.* **56**, 21-26 (1996).
261. Feltkamp,M.C. *et al.* Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2242-2249 (1993).
262. Rensing,M.E. *et al.* Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA- A*0201-binding peptides. *J. Immunol.* **154**, 5934-5943 (1995).
263. Vitiello,A., Marchesini,D., Furze,J., Sherman,L.A. & Chesnut,R.W. Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex. *J. Exp. Med.* **173**, 1007-1015 (1991).
264. Meneguzzi,G., Cerni,C., Kieny,M.P. & Lathe,R. Immunization against human papillomavirus type 16 tumor cells with recombinant vaccinia viruses expressing E6 and E7. *Virology* **181**, 62-69 (1991).
265. He,Z. *et al.* Viral recombinant vaccines to the E6 and E7 antigens of HPV-16. *Virology* **270**, 146-161 (2000).
266. Chen,L.P., Thomas,E.K., Hu,S.L., Hellstrom,I. & Hellstrom,K.E. Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 110-114 (1991).

267. Muderspach, L. *et al.* A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV 16 positive. *Clin. Cancer Res.* **6**, 3406-3416 (2000).
268. van Driel, W.J. *et al.* Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma: clinical evaluation of a phase I-II trial. *Eur. J. Cancer* **35**, 946-952 (1999).
269. Alexander, M. *et al.* Generation of tumor-specific cytolytic T lymphocytes from peripheral blood of cervical cancer patients by in vitro stimulation with a synthetic human papillomavirus type 16 E7 epitope. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **175**, 1586-1593 (1996).
270. Evans, C. *et al.* HLA-A2-restricted peripheral blood cytolytic T lymphocyte response to HPV type 16 proteins E6 and E7 from patients with neoplastic cervical lesions. *Cancer Immunol. Immunother.* **42**, 151-160 (1996).
271. Evans, E.M., Man, S., Evans, A.S. & Borysiewicz, L.K. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res.* **57**, 2943-2950 (1997).
272. Jochmus, I. *et al.* Specificity of human cytotoxic T lymphocytes induced by a human papillomavirus type 16 E7-derived peptide. *J. Gen. Virol.* **78 (Pt 7)**, 1689-1695 (1997).
273. De Bruijn, M.L. *et al.* Immunization with human papillomavirus type 16 (HPV16) oncoprotein-loaded dendritic cells as well as protein in adjuvant induces MHC class I-restricted protection to HPV16-induced tumor cells. *Cancer Res.* **58**, 724-731 (1998).
274. Santin, A.D. *et al.* Induction of human papillomavirus-specific CD4(+) and CD8(+) lymphocytes by E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with human papillomavirus type 16- and 18-positive cervical cancer. *J. Virol.* **73**, 5402-5410 (1999).
275. Doan, T. *et al.* Peripheral tolerance to human papillomavirus E7 oncoprotein occurs by cross-tolerization, is largely Th-2-independent, and is broken by dendritic cell immunization. *Cancer Res.* **60**, 2810-2815 (2000).
276. Doan, T. *et al.* Mice expressing the E7 oncogene of HPV16 in epithelium show central tolerance, and evidence of peripheral anergising tolerance, to E7-encoded cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *Virology* **244**, 352-364 (1998).
277. Doan, T. *et al.* Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein expressed in peripheral epithelium tolerizes E7-directed cytotoxic T-lymphocyte precursors restricted through human (and mouse) major histocompatibility complex class I alleles. *J. Virol.* **73**, 6166-6170 (1999).

278. Rensing,M.E. *et al.* Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A *0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res.* **56**, 582-588 (1996).
279. Borysiewicz,L.K. *et al.* A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* **347**, 1523-1527 (1996).
280. Tindle,R.W. *et al.* Nonspecific down-regulation of CD8+ T-cell responses in mice expressing human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from the keratin-14 promoter. *J. Virol.* **75**, 5985-5997 (2001).
281. Schiller,J.T. & Roden,R.B.S. Papillomavirus-like particles. *Papillomavirus Rep.* 1995; 6, 121-128. 1995.
282. Muller,M. *et al.* Chimeric papillomavirus-like particles. *Virology* **234**, 93-111 (1997).
283. Nardelli-Haeffliger,D. *et al.* Mucosal but not parenteral immunization with purified human papillomavirus type 16 virus-like particles induces neutralizing titers of antibodies throughout the estrous cycle of mice. *J. Virol.* **73**, 9609-9613 (1999).
284. Rose,R.C. *et al.* Oral vaccination of mice with human papillomavirus virus-like particles induces systemic virus-neutralizing antibodies. *Vaccine* **17**, 2129-2135 (1999).
285. De Bruijn,M.L. *et al.* L1-specific protection from tumor challenge elicited by HPV16 virus- like particles. *Virology* **250**, 371-376 (1998).
286. Kaufmann,A.M. *et al.* HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles induce specific HLA-restricted T cells in humans after in vitro vaccination. *Int. J. Cancer* **92**, 285-293 (2001).
287. Schafer,K. *et al.* Immune response to human papillomavirus 16 L1E7 chimeric virus-like particles: induction of cytotoxic T cells and specific tumor protection. *Int. J. Cancer* **81**, 881-888 (1999).
288. Sambrook,J., Fritsch,E.F. & Maniatis,T. *Molecular Cloning, a laboratory Manual.* Cold Spring Harbour Laboratory, (1989).
289. Spector,D.L., Goldman,R.D. & Leinwand,L.A. *Cells, a laboratory Manual.* Cold Spring Harbour Laboratory, (1998).
290. Kirnbauer,R. *et al.* Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J. Virol.* **67**, 6929-6936 (1993).
291. Shi,W. *et al.* Human papillomavirus type 16 E7 DNA vaccine: mutation in the open reading frame of E7 enhances specific cytotoxic T-lymphocyte induction and antitumor activity. *J. Virol.* **73**, 7877-7881 (1999).

292. Leder,C., Kleinschmidt,J.A., Wiethe,C. & Muller,M. Enhancement of capsid gene expression: preparing the human papillomavirus type 16 major structural gene L1 for DNA vaccination purposes. *J. Virol.* **75**, 9201-9209 (2001).
293. Birnboim,H.C. & Doly,J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523 (1979).
294. Hanahan,D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580 (1983).
295. Hanahan,D. Techniques for transformation of *E. coli*. DNA cloning – a practical approach. IRL Press Oxford, (1985).
296. Lindenmaier,W., Hauser,H., de Wilke,I.G. & Schutz,G. Gene shuttling: moving of cloned DNA into and out of eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res.* **10**, 1243-1256 (1982).
297. Tindle,R.W. *et al.* A vaccine conjugate of 'ISCAR' immunocarrier and peptide epitopes of the E7 cervical cancer-associated protein of human papillomavirus type 16 elicits specific Th1- and Th2-type responses in immunized mice in the absence of oil-based adjuvants. *Clin. Exp. Immunol.* **101**, 265-271 (1995).
298. Tindle,R.W., Fernando,G.J., Sterling,J.C. & Frazer,I.H. A "public" T-helper epitope of the E7 transforming protein of human papillomavirus 16 provides cognate help for several E7 B-cell epitopes from cervical cancer-associated human papillomavirus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 5887-5891 (1991).
299. Fossum,C., Bergstrom,M., Lovgren,K., Watson,D.L. & Morein,B. Effect of iscoms and their adjuvant moiety (matrix) on the initial proliferation and IL-2 responses: comparison of spleen cells from mice inoculated with iscoms and/or matrix. *Cell Immunol.* **129**, 414-425 (1990).
300. Fu,S. & Deisseroth,A.B. Use of the cosmid adenoviral vector cloning system for the in vitro construction of recombinant adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **8**, 1321-1330 (1997).
301. Armitage,R.J. *et al.* Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* **357**, 80-82 (1992).
302. Selvey,L.A., Dunn,L.A., Tindle,R.W., Park,D.S. & Frazer,I.H. Human papillomavirus (HPV) type 18 E7 protein is a short-lived steroid- inducible phosphoprotein in HPV-transformed cell lines. *J. Gen. Virol.* **75 (Pt 7)**, 1647-1653 (1994).
303. Zhong,L., Granelli-Piperno,A., Choi,Y. & Steinman,R.M. Recombinant adenovirus is an efficient and non-perturbing genetic vector for human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **29**, 964-972 (1999).

304. Hirschowitz,E.A., Weaver,J.D., Hidalgo,G.E. & Doherty,D.E. Murine dendritic cells infected with adenovirus vectors show signs of activation. *Gene Ther.* **7**, 1112-1120 (2000).
305. Porgador,A. & Gilboa,E. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **182**, 255-260 (1995).
306. Ureta-Vidal,A., Firat,H., Perarnau,B. & Lemonnier,F.A. Phenotypical and functional characterization of the CD8+ T cell repertoire of HLA-A2.1 transgenic, H-2KbnullDbnull double knockout mice. *J. Immunol.* **163**, 2555-2560 (1999).
307. Bauer,M., Wagner,H. & Lipford,G.B. HPV type 16 protein E7 HLA-A2 binding peptides are immunogenic but not processed and presented. *Immunol. Lett.* **71**, 55-59 (2000).
308. Steitz,J., Bruck,J., Knop,J. & Tuting,T. Adenovirus-transduced dendritic cells stimulate cellular immunity to melanoma via a CD4(+) T cell-dependent mechanism. *Gene Ther.* **8**, 1255-1263 (2001).
309. Fernando,G.J., Stewart,T.J., Tindle,R.W. & Frazer,I.H. Th2-type CD4+ cells neither enhance nor suppress antitumor CTL activity in a mouse tumor model. *J. Immunol.* **161**, 2421-2427 (1998).
310. Tindle,R.W. Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 643-650 (1996).
311. Boursnell,M.E. *et al.* Construction and characterisation of a recombinant vaccinia virus expressing human papillomavirus proteins for immunotherapy of cervical cancer. *Vaccine* **14**, 1485-1494 (1996).
312. Ortner,U. *et al.* An improved isolation method for murine migratory cutaneous dendritic cells. *J. Immunol. Methods* **193**, 71-79 (1996).
313. Vremec,D. *et al.* The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **176**, 47-58 (1992).
314. Toes,R.E. *et al.* Enhancement of tumor outgrowth through CTL tolerization after peptide vaccination is avoided by peptide presentation on dendritic cells. *J. Immunol.* **160**, 4449-4456 (1998).
315. Wan,Y. *et al.* Dendritic cell-derived IL-12 is not required for the generation of cytotoxic, IFN-gamma-secreting, CD8(+) CTL in vivo. *J. Immunol.* **167**, 5027-5033 (2001).
316. Son,Y.I. *et al.* A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. *J. Immunol. Methods* **262**, 145-157 (2002).

317. Klein,C., Bueler,H. & Mulligan,R.C. Comparative analysis of genetically modified dendritic cells and tumor cells as therapeutic cancer vaccines. *J. Exp. Med.* **191**, 1699-1708 (2000).
318. Jenne,L., Schuler,G. & Steinkasserer,A. Viral vectors for dendritic cell-based immunotherapy. *Trends Immunol.* **22**, 102-107 (2001).
319. Ludewig,B. *et al.* Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. *J. Exp. Med.* **191**, 795-804 (2000).
320. Kaplan,J.M. *et al.* Induction of antitumor immunity with dendritic cells transduced with adenovirus vector-encoding endogenous tumor-associated antigens. *J. Immunol.* **163**, 699-707 (1999).
321. Yang,S., Linette,G.P., Longerich,S., Roberts,B.L. & Haluska,F.G. HLA-A2.1/K(b) transgenic murine dendritic cells transduced with an adenovirus encoding human gp100 process the same A2.1-restricted peptide epitopes as human antigen-presenting cells and elicit A2.1- restricted peptide-specific CTL. *Cell Immunol.* **204**, 29-37 (2000).
322. Ribas,A. *et al.* Genetic immunization for the melanoma antigen MART-1/Melan-A using recombinant adenovirus-transduced murine dendritic cells. *Cancer Res.* **57**, 2865-2869 (1997).
323. Wang,L. *et al.* Rearrangement of S-100 immunoreactive Langerhans' cells in human psoriatic skin treated with peptide T. *J. Dermatol. Sci.* **9**, 20-26 (1995).
324. Wong,B.R. *et al.* TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 25190-25194 (1997).
325. Sallusto,F., Lenig,D., Forster,R., Lipp,M. & Lanzavecchia,A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401** , 708-712 (1999).
326. Tourdot,S. *et al.* A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2. 1- associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes. *Eur. J. Immunol.* **30**, 3411-3421 (2000).
327. Miller,G., Lahrs,S., Pillarisetty,V.G., Shah,A.B. & DeMatteo,R.P. Adenovirus infection enhances dendritic cell immunostimulatory properties and induces natural killer and T-cell-mediated tumor protection. *Cancer Res.* **62**, 5260-5266 (2002).
328. Cao,X. *et al.* Lymphotactin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvants for peptide delivery to induce specific antitumor immunity. *J. Immunol.* **161**, 6238-6244 (1998).

329. Ribas,A. *et al.* Genetic immunization for the melanoma antigen MART-1/Melan-A using recombinant adenovirus-transduced murine dendritic cells. *Cancer Res.* **57**, 2865-2869 (1997).
330. Ribas,A. *et al.* Immune deviation and Fas-mediated deletion limit antitumor activity after multiple dendritic cell vaccinations in mice. *Cancer Res.* **60**, 2218-2224 (2000).
331. Shimizu,Y., Guidotti,L.G., Fowler,P. & Chisari,F.V. Dendritic cell immunization breaks cytotoxic T lymphocyte tolerance in hepatitis B virus transgenic mice. *J. Immunol.* **161**, 4520-4529 (1998).
332. Öhlschläger, P. *et al.* Human Papillomavirus Type 16 L1 Capsoneres Induce L1-specific Cytotoxic T Lymphocytes and Tumor Regression in C57BL/6 Mice. Poster at 20th International Papillomavirus Conference, Paris October 4-9 2002.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

°C	Grad Celcius
3'-	Hydroxygruppenende der DNA
5'-	Phosphatgruppenende der DNA
⁵¹ Cr	Radioaktives Chromiumisotop
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
Ala	Alanin
APC	Antigen präsentierende Zelle
AP ^R	Ampicillin-Resistenzgen
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>american type culture collection</i>
ATG	Translationsstart
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Oberflächenantigene von Zellen)
cDNA	<i>complementary</i> DNA (zur mRNA)
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i> (Phosphatase aus dem Kälberdarm)
CMV	Cytomegalovirus
CMV-TO	regulierbarer CMV-Promotor
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
Cy3/Cy5	Cy-Chrome
Cys	Cystein
dATP	2'-Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosintriphosphat
dT/dTTP	2'-Desoxy-Thymidintriphosphat

Da	Dalton
DC	dendritische Zellen
DMEM	Dulbeccos modifiziertes <i>Eagle</i> Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DOC	Desoxycholsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
egfp/EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme linked immuno-sorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
G	Guanosin
g	Erdbeschleunigungskonstante
g	Gramm
Gly	Glycerin
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEBS	HEPES <i>buffered saline</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPV	humanes Papillomavirus
IFN γ	Interferon- γ
IFN γ -ELISPOT	IFN γ <i>enzyme-linked immunospot assay</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>

kb	1000 Basenpaare
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
μ	micro
M	Molar (mol/l)
mA	Miliampere
MEM	<i>minimum essential medium</i>
Met	Methionin
MHC I/II	Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse I/II
min	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
n	nano
N	Normal (Moläquivalent/l)
NaAc	Natriumacetat
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p	Plasmid bzw. Wert der statistischen Signifikanz
<i>p</i>	<i>Solanum tuberosum</i> optimierte Codons
P	Promotor
pAdcos	adenoviraler Cosmidvektor
Poly-A	Polyadenylierungssignal
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFU	<i>plaque forming unit</i>
Pro	Prolin
RANK	<i>receptor activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>RANK ligand</i>
RCA	<i>replication competent adenovirus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotation per minute</i>

SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec.	Sekunde
Ser	Serin
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/HCl-Borat-EDTA
TCR	T-Zellrezeptor
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TEP	Trypsin-EDTA-Lösung
Tet	Tetracyclin
TetO	Tetracyclin-Operatorsequenzen
Tet-R	Tetracyclin-Repressor
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
Thr	Threonin
TNF	Tumor-Nekrosis-Faktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TRANCE	<i>tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine</i>
TRANCE-R	<i>TRANCE receptor</i>
Tris	Tri-(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>units</i> (Einheit der Enzymaktivität)
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Jürgen Bode und Herrn Prof. Dr. Jürgen Wehland danke ich dafür, daß sie diese Arbeit vor der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Braunschweig vertreten. Herrn PD Dr. Thomas Brand danke ich für seine Bereitschaft zur Teilnahme an der Prüfungskommission.

Bei Herrn Dr. Werner Lindenmaier, in dessen Arbeitsgruppe an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig diese Arbeit angefertigt wurde, möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung eines überaus interessanten Themas, die uneingeschränkte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit sowie für die vielen konstruktiven Gespräche und Diskussionen bedanken. Herrn Dr. Kurt Dittmar möchte ich für sein Interesse an meiner Arbeit und seine Diskussionsbereitschaft danken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Robert W. Tindle, Tracy Doan und den anderen Mitarbeitern am 'Sir Albert Sakzweski Virus Research Centre' (SASVRC, RCH, Brisbane) für die erfolgreiche Kooperation und ihre Gastfreundschaft in Brisbane. Vor allem jedoch möchte ich mich bei Bob für seine Begeisterungsfähigkeit, seinen Enthusiasmus und Schaffensdrang, für seine Freundlichkeit, seinen Humor und insbesondere für seine Menschlichkeit, mit denen es ihm immer wieder gelingt, sowohl privat als auch während der wissenschaftlichen Arbeit, eine sehr positive Atmosphäre zu schaffen und seine Mitmenschen zu motivieren.

Ebenso danke ich Dr. Martin Müller, Prof. Dr. Lutz Gissmann und PD Dr. Jürgen Kleinschmidt (ATV, DKFZ, Heidelberg) für ihre Zusammenarbeit, ihre Diskussionsbereitschaft und vielen nützlichen Informationen über Papillomaviren.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Abteilung möchte ich mich für die ständige Hilfsbereitschaft und das nette Arbeitsklima bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Renate Bonewald, Karin Littman-Janßen, Ursula Herbort-Brand, Lars Macke und Dr. Horst Hannig für viele wertvolle und hilfreiche Hinweise sowie für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Meinen Eltern und Maie gilt mein besonders herzlicher Dank für die Förderung meines beruflichen Werdegangs, ihre Unterstützung in den zurückliegenden Jahren und ihr Vertrauen.

Lebenslauf

12.01.1972	Geboren in Fürstenau als Sohn von Franz-Josef Wiethe und seiner Ehefrau Margret Wiethe, geb. Brinkschröder
1978-1982	Katholische Grundschule Fürstenau
1982-1991	Integrierte Gesamtschule Fürstenau
1991	Abitur
1991-1992	Zivildienst im Katholischen Krankenhaus St. Reginenstift in Fürstenau
1992-1999	Studium der Biologie an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
1998-1999	Experimenteller Teil der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Lindenmaier/Dittmar an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig
1999	Diplom im Studiengang Biologie an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg Titel der Diplomarbeit: „Herstellung rekombinanter Adenoviren zur Modifikation dendritischer Zellen“
1999-2002	Wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe Lindenmaier/Dittmar an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig im Rahmen des Strategiefonds „Impfstoff gegen Krebs – Infektionsabwehr und Krebsprävention“
1999-2002	Experimenteller Teil der Dissertation
2000	Forschungsaufenthalt für 3 Monate im Labor von Prof. Tindle am `Sir Albert Sakzewski Virus Research Centre` (SASVRC) in Brisbane, Australien
2001-2002	Einjähriger Forschungsaufenthalt im Labor von Prof. Tindle am SASVRC in Brisbane, Australien